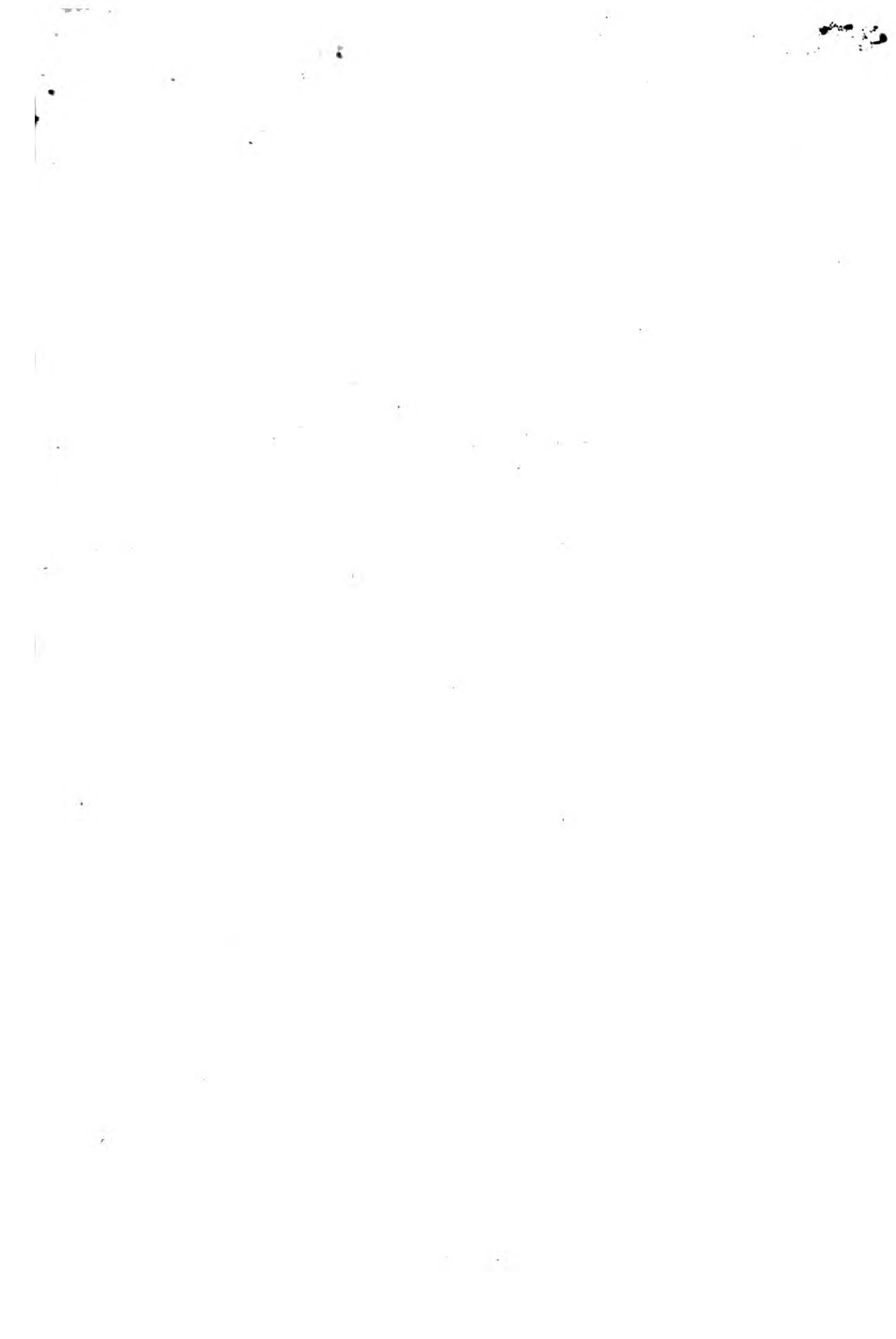




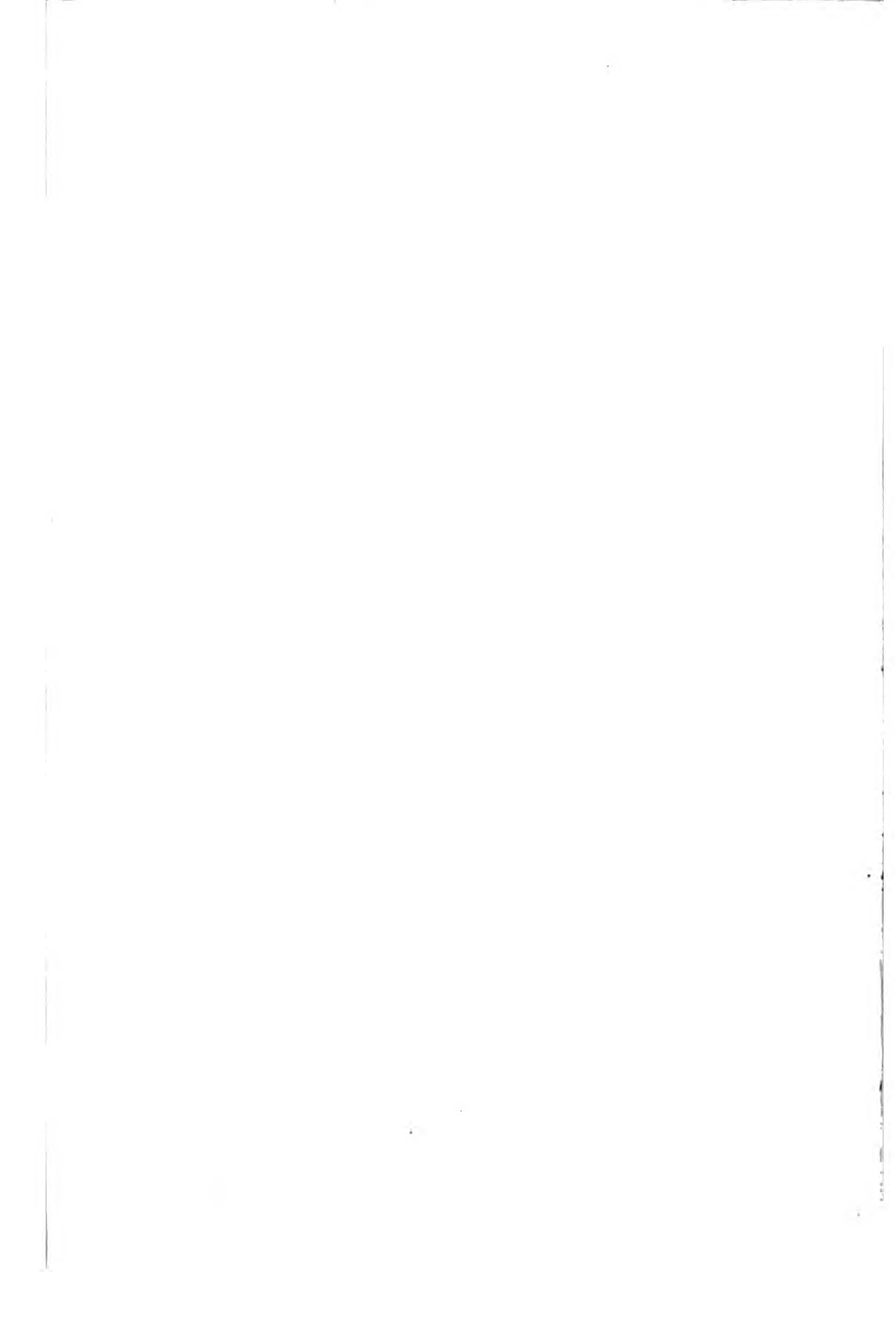


Dei
Sub Numine
Viget









Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

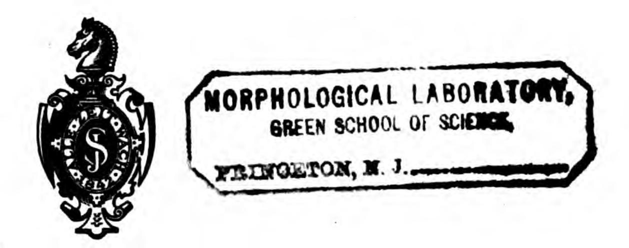
unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, **L. Asher**-Bern, **G. Bertrand**-Paris, **A. Bickel**-Berlin, **F. Blumenthal**-Berlin, **A. Bonanni**-Rom, **F. Bottazzi**-Neapel, **G. Bredig**-Karlsruhe i. B., **A. Durig**-Wien, **F. Ehrlich**-Breslau, **H. v. Euler**-Stockholm, **J. Feigl**-Hamburg, **S. Flexner**-New York, **J. Forssman**-Lund, **S. Fränkel**-Wien, **E. Freund**-Wien, **H. Freundlich**-Berlin-Dahlem, **E. Friedberger**-Greifswald, **E. Friedmann**-Berlin, **O. v. Fürth**-Wien, **G. Galeotti**-Neapel, **F. Haber**-Berlin-Dahlem, **H. J. Hamburger**-Groningen, **P. Hári**-Budapest, **A. Heffter**-Berlin, **V. Henri**-Paris, **V. Henriques**-Kopenhagen, **W. Heubner**-Göttingen, **R. Höber**-Kiel, **M. Jacoby**-Berlin, **A. Koch**-Göttingen, **M. Kumagawa**-Tokio, **F. Landolf**-Buenos Aires, **L. Langstein**-Berlin, **P. A. Levene**-New York, **L. v. Liebermann**-Budapest, **J. Loeb**-New York, **A. Loewy**-Berlin, **A. Magnus-Levy**-Berlin, **J. A. Mandel**-New York, **L. Marchlewski**-Krakau, **P. Mayer**-Karlsbad, **J. Meisenheimer**-Greifswald, **L. Michaelis**-Berlin, **H. Molisch**-Wien, **J. Morgenroth**-Berlin, **E. Münzer**-Prag, **W. Nernst**-Berlin, **W. Ostwald**-Leipzig, **W. Palladin**-St. Petersburg, **W. Pauli**-Wien, **R. Pfeiffer**-Breslau, **E. P. Pick**-Wien, **J. Pohl**-Breslau, **Ch. Porcher**-Lyon, **P. Rona**-Berlin, **S. Sa'askin**-St. Petersburg, **N. Sieber**-St. Petersburg, **M. Siegfried**-Leipzig, **S. P. L. Sörensen** Kopenhagen, **K. Spiro**-Straßburg, **E. H. Starling**-London, **J. Stoklasa**-Prag, **W. Straub**-Freiburg i. B., **A. Stutzer**-Königsberg i. Pr., **H. v. Tappeiner**-München, **H. Thoms**-Berlin, **P. Trendelenburg**-Rostock, **A. J. J. Vandevelde**-Gent, **O. Warburg**-Berlin, **W. Wiechowski**-Prag, **A. Wohl**-Danzig, **J. Wohlgemuth**-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Sechsundneunzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1919.

Inhaltsverzeichnis.

Die Rolle der Oxalsäure in der Pflanze.
Enzymatischer Abbau des Oxalations.

Von

Markus Staehelin.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Basel.)

(Eingegangen am 15. April 1919.)

Mit 3 Figuren im Text.

Einleitung.

Die organischen Säuren, die im Stoffwechsel der Succulenten eine bedeutende Rolle spielen, sind schon oft Gegenstand der Untersuchung gewesen. Beim Studium der dabei entstandenen Literatur erkennt man aber, daß trotz zahlreicher Arbeiten noch nicht alle Fragen gelöst sind, welche die eigenartige Erscheinung erklären, daß die Fettpflanzen am Morgen eine stark saure Reaktion zeigen, die während des Tages fast vollständig verschwindet, um während der Nacht von neuem wiederzukehren. Dieser Vorgang ist zwar ökologisch, als Anpassung der Succulenten an xerophytische Lebensweise, wohl verständlich. Diese Pflanzen sind durch die klimatischen Bedingungen, unter denen sie gedeihen, gezwungen, mit dem Wasservorrat äußerst haushälterisch umzugehen und deshalb Transpiration und Gaswechsel stark einzuschränken. Diese Erschwerung des Gasaustausches wird als Grund für die Entstehung organischer Säuren angesehen. Eine befriedigende physiologische Erklärung dieser für die Succulenten charakteristischen Erscheinung steht aber noch aus.

Der auch bei einigen Nichtsucculenten vorkommende Säurewechsel wurde noch viel weniger studiert und es konnte für ihn bisher nicht einmal eine ökologische Erklärung gefunden werden. Die von den verschiedenen Forschern über den Säurewechsel der Phanerogamen aufgestellten Hypothesen

hat K. Bassalik (1917) zusammengestellt. Da aber seine Ausführungen sehr kurz gefaßt sind, lasse ich einen historischen Überblick über die Entwicklung der Frage folgen.

Ad. Mayer (1875 und 1878) betrachtet die organischen Säuren, speziell die Isoäpfelsäure der Crassulaceen, als Produkte der Atmung, die durch die Einwirkung des Lichts unter stufenweiser Reduktion in Kohlenhydrate übergeführt werden.

Kraus (1886a) hält die Säureperiodizität bei Succulenten und Nichtsucculenten für eine allgemeine Erscheinung im Pflanzenreich, die aber bei den meisten Pflanzen wenig deutlich zutage tritt. Bei den Crassulaceen, bei denen diese periodische Säure-Zunahme und -Abnahme besonders deutlich ausgebildet ist, verfolgt Kraus (1886b) den Prozeß quantitativ. Die in der Nacht gebildete Säure ist nach diesem Autor als intermediäres Produkt der Atmung aufzufassen; wegen Sauerstoffmangel wird sie nicht weiter oxydiert. Die Säureabnahme am Tag ist einesteils durch das Licht bedingt, da die Säure photochemisch zerfällt, anderenteils aber wird diese durch den bei der Assimilation freiwerdenden Sauerstoff weiter oxydiert.

Eine etwas andere Auffassung des Säurewechsels vertritt de Vries (1885), nach dessen Untersuchungen die organischen Säuren sowohl am Tag wie auch in der Nacht als Produkte der Atmung gebildet, jedoch stets weiter oxydiert werden. Die Intensität der Oxydation ist vor allem bedingt durch Temperaturerhöhung; es ist aber nicht ausgeschlossen, daß das Licht einen Zerfall der Säure bewirkt. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die Nichtsucculenten.

Der Ansicht von Kraus schloß sich Warburg (1886) an. Er sieht in den organischen Säuren Produkte unvollständiger Verbrennung. Der Entsäuerungsprozeß hängt von Licht und Sauerstoff ab, ist jedoch nicht rein chemischer, sondern auch physiologischer Natur und steht mit dem Leben der Pflanze in enger Beziehung. Er fand auch (S. 112), daß die Fettpflanzen nicht nur die in ihren Zellen gebildete, sondern auch die von außen gebotene Säure verarbeiten.

Gerber (1896) verfolgt den Reifeprozeß der Früchte; bei diesem schwinden die Säuren bis auf ein Minimum, während parallel dazu eine Vermehrung des Zuckers erfolgt. Wie Mayer nimmt auch Gerber eine stufenweise Reduktion der organischen Säuren zu Kohlenhydraten an. Die Abnahme der Säure wird durch Sauerstoff, wie auch durch erhöhte Temperatur stark gefördert.

Nach Spoehr (1913) ist der Entsäuerungsprozeß der Succulenten nicht an den Lebensprozeß der Pflanze gebunden, sondern stellt einen rein photochemischen Prozeß dar, indem die organischen Säuren im Licht zerfallen.

Auch bei niederen Pflanzenorganismen wurde die Bildung der Oxalsäure studiert. Nach Wehmer (1891) ist die Oxalsäurebildung bei Aspergillus und Penicillium ein regulatorischer Prozeß, in-

dem bei der Veratmung der Glucose die Oxalsäure als intermediäres Produkt gebildet und, wenn nicht als unlösliches Salz abgelagert, sofort im Stoffwechsel weiterverarbeitet wird.

Bei den höheren Pflanzen untersuchte Benecke (1903) die Bedingungen, die zur Ablagerung des Oxalats führen. Es gelang ihm, beim Mais die Calciumoxalatablagerung zu vermehren, wenn er ihm Nitrat als Stickstoffnahrung bot; wird ihm aber Ammoniak als Stickstoffquelle dargereicht, so findet keine Oxalatablagerung statt.

Bei den Caryophyllaceen ist es Amar (1903) gelungen, in kalkfreien Medien oxalatfreie Pflanzen zu erhalten. Die Ablagerung des Oxalats ist auch hier ein regulatorischer Prozeß.

An die Ausführungen von Wehmer kann die Arbeit von Bassalik (1913) angeschlossen werden. Er isolierte den Bacillus extorquens, der die Fähigkeit besitzt, die Oxalsäure wie auch ihre Salze alz einzige Kohlenstoffquelle zu verarbeiten und damit seine Leibessubstanz aufzubauen. Von größerer Tragweite war die Tatsache, daß die Verarbeitung der Oxalsäure nicht nur durch den Bacillus selbst ausgeführt wurde, sondern auch durch ein von ihm produziertes Ektoenzym. Dieser Prozeß wurde darum von diesem Autor (S. 285) als ein enzymatischer aufgefaßt. Dieses Resultat mußte die Frage nahelegen, ob auch bei den grünen Pflanzen, in denen die Oxalsäure wie auch ihre Salze gefunden werden, ein Enzym vorhanden ist, das die Fähigkeit besitzt, die Oxalsäure und ihre Salze wieder in den Stoffwechsel der Pflanzen zu ziehen.

Die erste Mitteilung von einer enzymatischen Oxydation der Oxalsäure geht auf Zaleski und Reinhard (1911) zurück. Tränkten sie Weizenmehl mit Oxalsäure, so fanden sie eine größere Kohlendioxydausscheidung als bei der Durchtränkung des Mehles mit Wasser. Dabei war für die Verarbeitung Sauerstoff nötig; denn in einer Wasserstoffatmosphäre fanden sie keine Verarbeitung der Oxalsäure. Zur Charakterisierung dieses Prozesses als eines enzymatischen Vorganges setzten die beiden Forscher zu dem verwendeten Mehl Aceton und Äther zu, wobei die Oxydation der Oxalsäure ebensogut verlief wie bei dem nicht abgetöteten Weizenmehl. Daraus zogen sie den Schluß, im Weizenmehl müsse ein Enzym oder ein Katalysator vorhanden sein, die die Verarbeitung bewirke. Leider haben sie bei ihren Untersuchungen nur die Menge des ausgeschiedenen Kohlendioxyds, nicht aber, was wesentlich gewesen wäre, die Abnahme der Oxalsäure bestimmt. Den exakten Beweis dafür, daß im Weizen ein Enzym vorhanden sei, das die Oxalsäure verarbeitet, sind sie uns darum schuldig geblieben.

Bassalik (1917) wies dagegen nach, daß die Verarbeitung des Oxalations bei säurehaltigen Nichtsucculenten, insbesondere bei Rumex acetosa, auf enzymatische Weise erfolge.

Während wir bis vor kurzem über die Entstehung und besonders über die Abnahme der organischen Säuren uns nur ein recht dürftiges Bild machen konnten, eröffnete sich uns

durch die Arbeiten von Bassalik, Zaleski und Reinhard, die bei Bacillus extorquens, Rumex acetosa und Weizenmehl ein Oxalsäure verarbeitendes Enzym nachgewiesen haben, eine weite Perspektive.

Von den zahlreichen Fragen, die sich dabei erheben, suchte ich folgende zu beantworten:

1. Kommt ein die Oxalsäure verarbeitendes Enzym nur bei den genannten Pflanzen vor, oder hat es im Pflanzenreich eine allgemeine Verbreitung, so daß außer den von Bassalik untersuchten Pflanzen (Rumex, Begonia und Oxalis) noch andere Nichtsucculenten das von außen gebotene Oxalat verarbeiten?

2. Findet eine enzymatische Verarbeitung der Oxalsäure auch bei säurefreien Pflanzen statt?

3. Sind hierzu nur die Blätter befähigt, oder kann dieser Prozeß von allen Zellen der Pflanze durchgeführt werden?

4. Worin besteht die Kinetik des Prozesses?

Es wäre nun denkbar, daß säurefreie Pflanzen das in ihnen enthaltene Ca-Oxalat wegen seiner Unlöslichkeit nicht zu verarbeiten vermöchten, wohl aber imstande wären, die im Zellsaft löslichen Oxalatverbindungen abzubauen. In vorliegender Arbeit habe ich die Fähigkeit zur Verarbeitung des Ca-Oxalats nicht untersucht, sondern mich darauf beschränkt, zunächst einmal festzustellen, ob säurefreie Pflanzen überhaupt imstande seien, das ihnen in der zugänglichsten Form, also gelöst gebotene Oxalation zu verarbeiten.

Vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Dr. K. Bassalik, Assistent am Botanischen Institut der Universität Basel, in der Zeit vom Sommersemester 1917 bis Sommersemester 1918 ausgeführt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, ihm an dieser Stelle für seine wertvollen Ratschläge und stete Hilfsbereitschaft den herzlichsten Dank auszusprechen. Ebenso danke ich Herrn Prof. G. Senn, der mir bei der Abfassung der Arbeit mit Rat und Tat beistand.

Experimenteller Teil.

I. Methodik.

Die gestellten Fragen können nur dann einer befriedigenden Beantwortung zugeführt werden, wenn die analytische Methodik einwandfrei ist. Für meine Fragestellung kam eine acidimetrische Bestimmung der Säure nicht in Betracht, da die mit dieser Methode feststellbaren Aciditätsänderungen über die Änderung der Menge des Oxalations gar nichts aussagen.

Eine Kritik der Aciditätsbestimmung durch Titration ist deshalb notwendig, weil Steinmann (1917) in Anlehnung an viele frühere Forscher[1]) diese Methode bei seinen Untersuchungen über den Säurewechsel von Rhabarber angewendet hat. Sie leidet an dem prinzipiellen Fehler, daß durch die Titration nur die freien Wasserstoffionen der Pflanzensäuren bestimmt werden. Sind die organischen Säuren als freie Säuren oder als saure Salze im Zellsaft gelöst, so wäre deren titrimetrische Bestimmung unter Berücksichtigung der anderen Fehlerquellen möglich; sind aber die Säuren in der Zelle als neutrale Salze enthalten, so sind sie titrimetrisch überhaupt unfaßbar. Solche titrimetrische Untersuchungen von Pflanzensäften bieten jedoch wegen der Anwesenheit von gefärbten Stoffen (Gerbstoffe, Glucoside, Flavone, Chromotaphorenfarbstoffe und Anthocyane) große Schwierigkeiten bei der Feststellung eines scharfen Farbenumschlags. Darum sind die Resultate der Aciditätsbestimmungen früherer Forscher so reich an Widersprüchen. Eine kritische Zusammenstellung dieser Abweichungen findet sich in der Arbeit von K. Bassalik (1917).

Wenn man aber auch mit Hilfe der Titrationsmethode scharfe Farbenumschläge erhielte und alle Ionen der Säuren im Zellsaft frei zugegen wären, so müßte bei titrimetrischen Untersuchungen noch die Tatsache berücksichtigt werden, daß die Pflanzensäfte ein heterogenes Gemisch der verschiedensten Stoffe darstellen. Man wird nicht fehlgehen, wenn man in den

---

[1]) Kraus (1886a), Lange (1886), de Vries (1885), Warburg (1886).

Extraktionssäften, die zur Titration verwendet werden, eine große Menge kolloider Körper annimmt. Diese Körper bilden zweifellos eine starke Fehlerquelle. Die Kolloide sind dadurch charakterisiert, daß sie eine enorme Oberflächenentwicklung und damit verbunden eine starke Adsorptionsfähigkeit besitzen. Durch diese Eigenschaften werden sie eine bestimmte Menge der zugesetzten Lauge an ihren Oberflächen festhalten, und diese geht für die weitere Neutralisation der Säure verloren. Die Pflanzensäfte enthalten auch Eiweißkörper und deren Abbauprodukte. Wären diese neutrale Körper, so würden sie die Titration nicht stören. Da aber die Proteine, sowohl wie auch ihre Spaltprodukte, vor allem die Aminosäuren, amphotere Verbindungen sind (sie besitzen basische Eigenschaften wegen ihrer Aminogruppen und sauren Charakter wegen ihrer Carboxylgruppen), binden sie ebenfalls eine bestimmte Hydroxylmenge.

So zeigt die Kritik, daß wir durch Aciditätsbestimmungen keine Auskunft erhalten über die Zu- und Abnahme des Säureanions bzw. des Oxalations bei den Rumexarten oder des Malations bei den Crassulaceen. Die bei den Crassulaceen in der Nacht stattfindende Aciditätszunahme beweist noch lange nicht eine Zunahme des Malations, sondern nur eine Zunahme der freien Wasserstoffionen, die von verschiedenen Stoffen herstammen können, und eine Abnahme der Acidität am Tage sagt nichts Bestimmtes aus über eine Abnahme des Säureanions, sondern nur, daß sich die Menge der Wasserstoffionen verringert hat.

Bei meinen Versuchen war also die Titrationsmethode von vornherein ausgeschlossen. Um befriedigende Resultate zu erhalten, mußte ich die Abnahme des Oxalations selbst quantitativ feststellen.

a) Analyse.

Der Analysengang war kurz folgender:

Nach Abbruch des Versuchs versetzen des Blattpulvers mit konzentrierter Essigsäure und sofortiges Aufkochen. Filtrieren durch Chamberlandkerzen (im Vakuum). Das völlig klare Filtrat wird mit Ammoniak versetzt bis zum Eintritt alkalischer Reaktion, die sich durch eine gelbe bis braune Färbung erkennbar macht. Aufkochen und 24 Stunden stehen lassen. Abfiltrieren des gefällten Niederschlags durch Chamberlandkerzen.

Versetzen des Filtrats mit konzentrierter Essigsäure bis zur sauren Reaktion, Aufkochen und abermals 24stündiges Stehenlassen. Filtrieren durch Chamberlandkerzen; Filtrat erwärmen und mit Calciumacetat in der Hitze versetzen; 24stündiges Absitzenlassen. Das evtl. ausgefallene weiße Calciumoxalatpulver kalt durch Chamberlandkerzen abfiltrieren; zuerst mit ammoniakhaltigem heißem, darauf mehrmals mit kaltem destilliertem Wasser spülen und schließlich in 2 norm. heißer Schwefelsäure lösen, mit heißem Wasser ausspülen und dieses wasserklare Filtrat gegen $^{n}/_{10}$-Kaliumpermanganatlösung bis zur bleibenden Rosafärbung titrieren. Die Brauchbarkeit und Zuverlässigkeit dieser Methode hat K. Bassalik (1917) festgestellt.

Bei Blattpulvern, deren Calcium nicht an Oxalat gebunden ist und evtl. durch die Essigsäure in Lösung geht, wird durch einen Kontrollversuch der Teil des von außen zugeführten Oxalats bestimmt, der während des Versuchs durch das Calcium des Blattes gebunden wird. Dieser Kontrollversuch wird in folgender Weise durchgeführt.

Zu einer abgewogenen Menge trocknen Pflanzenpulvers wurden 25 ccm destilliertes Wasser und 10 ccm konzentrierte Essigsäure zugesetzt und aufgekocht. Nach dem Erkalten wurden 50 ccm einer bestimmten Ammoniumoxalatlösung zugesetzt, dann der oben skizzierte Analysengang eingeschlagen. Aus der Differenz der zugesetzten und der wiedergefundenen Oxalatmenge ergab sich die Menge Oxalat, die durch das Calcium gebunden wird, welches durch die Essigsäure in Freiheit gesetzt wurde.

Zu 2,0 g Helianthus annuus Blattpulver zugesetzt . . .	0,1527 g C_2O_4''
Es wurde nachher gefunden	0,0290 g C_2O_4''
Durch gelöstes Calcium gebunden	0,1237 g C_2O_4''
Zu 1,0 g Spirogyra spec. wurde zugesetzt	0,2090 g C_2O_4''
Es wurde nachher noch gefunden	0,1115 g C_2O_4''
Durch gelöstes Calcium gebunden	0,0975 g C_2O_4''
Zu 1 g Mesembryanthemum linguae zugesetzt	0,1448 g C_2O_4''
Es wurde nachher noch gefunden	0,1021 g C_2O_4''
Folglich durch lösliches Calcium gebunden .	0,0427 g C_2O_4''

Bei der Untersuchung von Samen mußte der Gang der Analyse abgeändert werden, um die Lösung der Stärke zu verhindern, da die bei ihrer Hydrolyse entstehenden Produkte die Bestimmung des Oxalations unmöglich gemacht hätten.

Zu einer abgewogenen Menge von Weizenmehl wurde eine abgewogene Menge wasserfreies Natriumoxalat gegeben. Dieses Gemisch wurde mit 50 ccm destilliertem Wasser gut vermengt und vor der Analyse mit so viel Alkohol versetzt, bis die Gesamtflüssigkeitsmenge 80 % Alkohol enthielt. Dieser Alkohol verhinderte die Lösung der Stärke und

konnte zugleich Eiweißstoffe fällen. Diese Lösung wurde während 5 Minuten aufgekocht, dann durch Chamberlandkerzen filtriert und mehrmals mit 80% Alkohol gewaschen. Oft war es nötig, das Filtrat ein zweites Mal zu filtrieren, wenn die Flüssigkeit noch Stärke enthielt, was an der Trübung des Filtrates erkannt werden konnte. Das klare Filtrat wurde mit Essigsäure gekocht, um die letzten Reste der Stärke und Eiweißkörper zu hydrolisieren und den Alkohol zu verjagen. Ein evtl. noch entstehender Niederschlag wurde nach 24stündigem Stehenlassen durch Chamberlandkerzen abfiltriert, das Filtrat heiß mit Calciumacetat versetzt und hierauf zur Titration gleich behandelt, wie die aus den Blattpulvern gewonnenen Niederschläge. Dieser Analysengang lieferte zuverlässige Resultate, wie folgende Kontrollversuche beweisen:

Zu 2,0 g Weizenmehl zugesetzt 0,3290 g $Na_2C_2O_4$,
gefunden wurde 0,3288 g = 99,9%.
Zu 2,0 g Weizenmehl zugesetzt 0,4185 g $Na_2C_2O_4$,
gefunden wurde 0,4178 g = 99,8%.
Zu 10,0 g Weizenmehl zugesetzt 0,3403 g $Na_2C_2O_4$,
gefunden wurde 0,3399 g = 99,8%.

b) Darstellung der Enzympräparate.

Aus Bassaliks Untersuchungen geht hervor, daß die Verarbeitung des Oxalations ein enzymatischer Prozeß ist. Zur Darstellung eines wirksamen Enzympräparates aus Blättern Stengeln, Wurzeln und Samen stehen verschiedene Wege offen. Entweder kann die Preßsaftmethode, wie sie Buchner (1903) bei seiner Zymase-Untersuchung verwendet hat, angewandt werden, oder die Gefriermethode von Palladin (1906). Letztere hat Bassalik (1917) mit Erfolg benützt. Für meine Untersuchung war sie nicht geeignet, weil in den meisten Organen der von mir untersuchten Pflanzen die Oxalationen nur in so geringen Mengen vorhanden waren, daß sie schon während der Abkühlung restlos verarbeitet werden konnten.

Die für meine Zwecke praktischere Darstellungsweise geht auf Brown und Morris (1893) zurück, die sie zur Darstellung der Diastase aus verschiedenen Blättern benützten. Die gesammelten Pflanzenteile wurden im Trockenschrank bei einer Temperatur von 40 bis 50° möglichst rasch getrocknet; darauf wurden die getrockneten Pflanzen in einer sterilen Reibschale zu feinem Pulver zerrieben. Diese Präparate wurden gut verschlossen im Dunkeln aufbewahrt und waren noch nach mehreren Monaten wirksam.

Bei der Darstellung von Enzympräparaten ist ein möglichst rasches Töten der Zelle Haupterfordernis, wobei jedoch eine Schädigung des Enzyms vermieden werden muß. Deshalb konnte keine hohe Temperatur angewendet werden, die die Pflanze zwar am raschesten getötet, jedoch die gegen hohe Temperatur sehr empfindlichen Enzyme geschädigt hätte. Um dies zu vermeiden, konnte ich nicht über 40 bis 50° gehen, was eine Trocknungsdauer von 2 bis 24 Stunden nötig machte. Da die Enzyme bei mittleren Temperaturen eine rege Tätigkeit entfalten, hat diese lange Trocknungsdauer den Nachteil, daß sich die verschiedenen Enzyme der Pflanze gegenseitig schädigen konnten. Trotz dieser Nachteile bewährte sich diese Methodik gut.

Um aus dem Samen ein gutes Präparat darzustellen, mußte das Verfahren etwas abgeändert werden. Die Samen wurden zuerst mehrmals gemahlen und dann erst getrocknet. Es hat sich nämlich gezeigt, daß die ungemahlenen Samen zum Trocknen eine bedeutend längere Zeit erfordern als die Blätter. Diese lange Trocknungsdauer, verbunden mit relativ hoher Temperatur, hatte eine schädigende Wirkung auf das Enzym, so daß ich nur minderwertige Präparate erhielt. Dies geht aus folgendem Versuch hervor:

Versuch 1.

Dreitägiger gekeimter Samen von Pisum sativum wurde ungemahlen 6 Wochen auf dem Heizkörper getrocknet; Temperatur 30°.

Zu 5,0 g dieses Präparats (I) wurde zugesetzt . . . . = 0,1642 g C_2O_4''
Nach dem Versuch wurde gefunden . . . . = 0,1322 g C_2O_4''

Während 24 Std. wurde bei 35° verarbeitet . . . . . = 0,0320 g C_2O_4''
= 19,4 %.

Dreitägiger gekeimter Pisumsamen wurde gemahlen 24 Stunden bei 40° getrocknet.

Zu 5,0 g dieses Präparats (II) wurde zugesetzt . . . . = 0,1590 g C_2O_4''
Nach Abbruch des Versuchs wurde gefunden . . . . = 0,0594 g C_2O_4''

Während 24 Stunden wurde bei 36° verarbeitet . . . = 0,0996 g C_2O_4''
= 62,6 %.

Zu 5,0 g des Präparats (II) wurde nach einer Lagerung während 6 Monaten zugesetzt . . . . = 0,1874 g C_2O_4''
Nach dem Versuch wurde gefunden . . . . = 0,0849 g C_2O_4''

Während 24 Stunden wurde bei 35° verarbeitet . . . = 0,1025 g C_2O_4''
= 54,7 %.

Diese Versuche zeigen deutlich den schädigenden Einfluß langen Trocknens, zugleich aber auch, daß das wirksame Enzympräparat (II) nach 6 Monaten des Lagerns wenig von seiner Wirksamkeit eingebüßt hat.

Die Stengel, Wurzeln und die fleischigen Blätter von Mesembryanthemum schnitt ich vor dem Trocknen längs und quer, um die Dauer des Trocknens abzukürzen.

Folgende Versuchsreihe soll zeigen, inwiefern die Art, wie die Blätter getrocknet werden, einen Einfluß auf die Wirksamkeit des Enzyms ausübt. Da es zu viel Zeit gekostet hätte, für jede Pflanze die günstigste Temperatur und Bedingung des Trocknens auszuprobieren, wurden alle Pflanzenteile bei derselben Temperatur getrocknet. Der Einfluß der Trocknungsweise der Pflanzenorgane geht aus folgendem Beispiel hervor:

Ich verwendete Blätter von Rheum officinale (eine kultivierte Art), die zur selben Zeit und vom selben Stock gepflückt und unter den verschiedensten Bedingungen getrocknet wurden.

Versuch 1.

100,0 g Rheumblätter ohne Blattnerven wurden bei 40° im Thermostaten 24 Stunden getrocknet. Die Ausbeute an lufttrocknem Pulver betrug 15,10 g.

Versuch 2.

100,0 g von denselben Blättern wurden im Trockenschrank bei 105° 2 Stunden getrocknet; dann wurden die Blätter, um sie lufttrocken zu machen, für 10 Stunden in die Dunkelkammer gebracht, darauf wurden sie zu Pulver zerstoßen; sie ergaben 15,51 g Pulver.

Versuch 3.

100,0 g Blätter wurden an der Sonne getrocknet. Die Temperatur schwankte zwischen 17 bis 34°; an Lufttrockenpulver erhielt ich 14,4 g.

Versuch 4.

100,0 g Blätter wurden mit einer Fleischhackmaschine zerkleinert; die so erhaltene breiige Masse wurde in dünner Schicht auf eine Glasplatte gestrichen und rasch in einem heißen Luftstrom getrocknet. Die trockne Masse wurde dann pulverisiert. Ausbeute 12,2 g Blattpulver.

Versuch 5.

100,0 g Blätter trockneten im Dunkelzimmer 14 Tage bei einer Temperatur von 18 bis 20°. Die Blätter waren nach dieser Zeit noch nicht völlig lufttrocken; das Pulver wog 21,5 g.

Von den so dargestellten Pulvern wurden je 2,0 g verwendet, um ihre Wirkung in bezug auf die Oxalatverarbeitung zu prüfen. Zu der Blattpulvermenge wurde eine bestimmte Ammoniumoxalatmenge zugesetzt und nach Ablauf des Versuchs das noch unverarbeitete Oxalat bestimmt (siehe auch Versuchsanordnung S. 12).

Dauer des Versuchs 24 Stunden, Temperatur 33°; zum Fernhalten von Mikroorganismen wurde 1 Vol.-% Toluol zugesetzt.

Tabelle I.

Versuch	Vorbehandlung		C_2O_4'' zugesetzt zum Blattpulver	C_2O_4'' gef. nach 24 Std.	C_2O_4''-Abnahme	% d. Abnahme
	Temp.	Dauer	g	g	g	
1	40°	24h	0,2462	0,0915	0,1547	62,8
2	105°	2h	0,2462	0,2035	0,0427	17,3
3	(17—34°)	8h	0,2186	0,1395	0,0791	36,1
4	Heißluft	2h	0,2178	0,1518	0,0660	30,3
5	18—20°	14 Tage	0,2174	0,1166	0,1008	46,4

Die Versuche zeigen, daß die Herstellungsart der Blattpulver auf den Abbau des zugesetzten Oxalations von ausschlaggebender Bedeutung ist. Als günstigste Darstellungsart hat sich, wie Versuch 1 beweist, das 24stündige Trocknen der Blätter bei 40° unter Lichtabschluß erwiesen. Beim 2stündigen Trocknen bei einer Temperatur von 105° erhält man, wie Versuch 2 zeigt, die schwächste Verarbeitung; hier ist das Enzym stark geschädigt, nicht aber völlig abgetötet worden.

Bessere Resultate erzielt man, wie Versuch 5 zeigt, durch das Trocknen der Blätter bei Zimmertemperatur unter Ausschluß von Licht. Hierbei ist eine schädigende Wirkung von Temperatur und von Licht ausgeschlossen, wohl aber infolge der langen Dauer der Trocknung eine ungünstige gegenseitige Wirkung der verschiedenen in den Zellen enthaltenen Enzyme denkbar.

Versuch 4 zeigt, daß auch das bei hoher Temperatur beschleunigte Trocknen eines dünnen auf eine Glasplatte ausgestrichenen Blattbreies das Enzym schädigt.

Außer der hohen Temperatur übt auch das Licht einen schädigenden Einfluß auf das Enzym aus, wie Versuch 3 zeigt. Hier wird es durch die direkten Sonnenstrahlen geschädigt.

c) Versuchsanordnung.

Um Wiederholungen zu vermeiden, soll die Versuchsanordnung hier generell besprochen werden. Wo von ihr abgewichen werden mußte, gebe ich die abweichende Anordnung ausdrücklich an.

Das das Enzym enthaltende Blattpulver wurde in einen 200 ccm fassenden Kolben mit Helmaufsatz gebracht und mit einer bestimmten Menge Oxalatlösung vermengt. Diese wurde mittels einer Bürette oder einer Pipette abgemessen.

Die Kolben wurden während des Versuchs in ein Wasserbad von konstanter Temperatur gestellt. Vor den Versuchskolben schaltete ich eine Vorlage mit 60%iger Kalilauge, um die Kohlensäure der durchgeleiteten Luft zu absorbieren; hinter dem Kolben war eine Pettenkofersche Absorptionsröhre mit einer genau bestimmten Menge titrierter Barytlauge angeschlossen. Diese war mit einem Aspirator in Verbindung, der eine 12stündige Durchsaugung von kohlendioxydfreier Luft gestattete.

Oft war es von Wert, die stündlich durchfließende Luftmenge genau kennen zu lernen; darum wurde noch ein Gasometer in die Versuchsanordnung eingeschaltet. Um Mikroorganismen fernzuhalten, wurde in jeden Versuchskolben 1 bis 2 ccm Toluol zugegeben und nachher der Kolbeninhalt tüchtig durchgeschüttelt.

Zu den ersten Versuchen wurde den Blattpulvern Oxalsäure zugesetzt; doch konnte keine Abnahme des Oxalations konstatiert werden, weil die hohe Konzentration der Wasserstoff-Ionen das Enzym offenbar schädigte oder zerstörte. Viel besser eigneten sich oxalsaure Salze. Als brauchbarstes erwies sich Ammoniumoxalat, bei dessen Verarbeitung Ammoniumcarbonat gebildet wird. Dieses macht wohl das Versuchsmedium alkalisch; jedoch wird das gebildete Ammoniumcarbonat bei erhöhter Temperatur, weil es flüchtig ist, durch den Luftstrom, der den Versuchskolben passiert, weggeführt, so daß keine bedeutende schädigende Wirkung durch die Änderung der Wasserstoffionen-Konzentration zu fürchten ist. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde den Versuchskolben 10 ccm konz. Essigsäure zugesetzt und die Flüssigkeit quantitativ in einen Erlenmeyer-Kolben gespült und darin aufgekocht; darauf habe ich nach dem oben besprochenen Analysengang die unverarbeitete Menge der Oxalationen festgestellt.

Das ausgeschiedene Kohlendioxyd wurde durch Titration mit $^n/_{10}$-Salzsäure und Phenolphthalein als Indicator bestimmt.

II. Verbreitung des die Oxalsäure verarbeitenden Enzyms.

A. Verarbeitung des Oxalations durch chlorophyllhaltige Kryptogamen.

Zunächst habe ich einige Vertreter der Kryptogamen zur Herstellung von Trockenpulvern verwendet. Es wurden je

5,0 g des dargestellten Präparates mit 5 ccm Ammoniumoxalatlösung vermengt, nur von Spirogyra wurde 1,0 g zugesetzt; im Gegensatz zu den Versuchen mit anderen Pflanzen, die 24 Stunden dauerten, wirkte das Enzym von Spirogyra nur 6 Stunden.

Versuch	Pflanzenart	Temp. °C	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4'' Abnahme g	% der Abnahme
107	Scolopendrium vulgare Sm.	36	0,1317	0,0532	0,0785	59,6
109	Equisetum maximum Lam. (Telmateja Ehrh.)	36	0,1315	0,0438	0,0877	66,8
108	Leucobryum spec.	35	0,1320	0,0651	0,0669	50,6
110	Polytrichum commune L.	35	0,1307	0,0897	0,0410	31,4
113a	Spirogyra spec. vgl. S. 7	38	0,1025	0,0224	0,0801	78,1

Somit verarbeiten die chlorophyllhaltigen Kryptogamen das ihnen gebotene lösliche Oxalat.

B. Verarbeitung des Oxalations durch chlorophyllhaltige höhere Pflanzen.

a) Blattspreite.

Die im vorigen Abschnitt beschriebene Darstellungsmethode der Enzympräparate wurde sowohl bei säurehaltigen wie auch bei säurefreien Blättern in Anwendung gebracht. Es war jedoch nötig, die in den getrockneten Blattpulvern enthaltenen, in Essigsäure löslichen Oxalatmengen quantitativ zu bestimmen, weil diese während des Versuches ebenfalls der Verarbeitung anheimfallen. Zu diesem Zwecke wurden 5,0 g des getrockneten Blattpulvers in oben beschriebener Weise analysiert; die Werte dieser Analysen sind in Kolonne 7 der Tabelle II angeführt. In vielen getrockneten Blättern finden sich lösliche Oxalate, während in anderen Blattpulvern nur Spuren oder überhaupt keine Oxalate mehr quantitativ festgestellt werden können. Dies darf jedoch nicht zu dem Schluß verleiten, daß in letzteren Oxalate niemals gebildet werden; denn man muß bedenken, daß die Enzyme beim Trocknen, besonders bei erhöhter Temperatur, ihre Tätigkeit fortsetzen und dabei die löslichen Oxalate verarbeiten.

In den Versuchen wurden 5,0 g des getrockneten Blattpulvers verwendet und eine abgemessene Ammoniumoxalatlösung

Tabelle II.

Verarbeitung des Oxalations durch Blattpulver.

Versuchs-Nr.	Pflanzenart	Alter der Blätter	Dauer des Trocknens Std.	Temp. des Versuchs °C	Blattpulvermenge	C_2O_4'' in getr. Material g	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' nach 24 Std. gefunden g	C_2O_4'' Abnahme nach 24 Std. g	% der Abnahme	Ausgeschieden CO_2 mg
110/130	Rumex maximus	mittelalte Blätter	48	33	5,0	0,0733	0,2462	0,1793	0,1402	43,9	n. bestimmt
17/20	Rheum officinale L. (kultivierte Art)	junge Blätter . .	24	34	5,0	0,0638	0,1545	0,0495	0,1688	77,3	56,3
47/25	Oxalis Acetosella L.	junge Blätter . .	24	34	5,0	0,0515	0,1787	0,0697	0,1605	71,8	n. bestimmt
16/24	Rumex acetosa L.	mittelalte Blätter	24	34	5,0	0,0513	0,1545	0,0499	0,1559	75,5	421,1
22/18	Spinacia oleracea L.	ältere Blätter . .	60	36	5,0	0,0382	0,1791	0,1463	0,0710	32,6	75,2
46/48	Fagopyrum esculentum Mönch .	jüngere Blätter .	24	36	5,0	0,0376	0,1747	0,0620	0,1503	70,8	n. bestimmt
14/26	Prunus domestica L.	sehr alte Blätter	48	35	5,0	0,0262	0,1524	0,1588	0,0198	10,8	Spuren
33/39	Persica vulgaris Mill.	ältere Blätter . .	24	36	5,0	0,0207	0,1735	0,0933	0,1009	48,0	25,9
37/43	Vitis vinifera L.	junge Blätter . .	24	36	5,0	0,0062	0,1784	0,0079	0,1771	95,9	19,6
13/28	Pirus Malus L.	alte Blätter . . .	60	36	5,0	0,0050	0,1515	0,1372	0,0193	12,3	Spuren

84/40	Ribes rubrum L.	mittlere Blätter .	48	36	5,0	0,0026	0,1742	0,0744	0,1024	41,5	75,2
38/34	Helianthus tuberosus L.	jüngere Blätter .	48	37	5,0	0,0026	0,1789	0,0136	0,1679	92,4	227,3
29/32	**Prunus avium L.**	**jüngere Blätter** .	48	37	5,0	Spuren	0,1782	0,0616	0,1166	65,3	115,3
45/42	Phaseolus vulgaris L.	sehr junge Blätter	24	36	5,0	—	0,1776	0,0660	0,1116	62,7	n. bestimmt
35/41	Helianthus annuus L.	junge Blätter . .	24	36	5,0	—	0,1742	nichts mehr	0,1742	100,0	72,0

zugesetzt. Die Dauer der Versuche betrug 24 Stunden; während dieser Zeit wurden durchschnittlich pro Stunde und Kolben $1^1/_2$ l kohlendioxydfreie Luft durchgeleitet. Die Versuche wurden im Dunkelzimmer des botanischen Institutes ausgeführt. Als Desinfiziens wurde 1 Volum-$^0/_0$ Toluol zugesetzt.

Aus den Versuchen geht hervor, daß alle untersuchten Blätter das ihnen von außen gebotene Oxalation vermöge eines enzymatischen Prozesses zu verarbeiten imstande sind; aber sie verarbeiten die ihnen gebotenen Oxalationen sehr ungleich stark. Die säurehaltigen Blattpulver von Oxalis, Rheum und Rumex verarbeiten während 24 Stunden bloß 77 $^0/_0$ der gesamten Oxalationen, während das säurefreie Blattpulver von Helianthus bei gleichlanger Versuchsdauer alles Oxalat verarbeitet.

Daß die Verarbeitung der Oxalationen von der Gegenwart des Sauerstoffes abhängt, hat Bassalik (1917) gezeigt.

Es könnte daher vermutet werden, daß bei den säurehaltigen Nichtsucculenten ähnliche Verhältnisse vorliegen wie bei den Succulenten, so daß infolge verminderter Sauerstoffzufuhr die Oxalate nicht in dem Maße verarbeitet werden, wie sie entstehen, was zu einer Anhäufung der Oxalate führen würde. Da aber die Blätter von Oxalis, Rheum und Rumex keine besonderen anatomischen Eigentümlichkeiten zeigen, die auf eine Erschwerung des Gaswechsels hinweisen, ist diese Vermutung hinfällig. Es wäre aber denkbar, daß bei den säurefreien Blättern, wie Helianthus, in denen kein lösliches Oxalat

gefunden wird, die entstehenden Oxalate durch die rege Tätigkeit des Enzyms stets verarbeitet werden und daß es darum zu keiner Ablagerung löslicher Oxalate komme. Bei den anderen säurefreien Pflanzen, die eine trägere Oxalatverarbeitung zeigen, würden die nicht in den enzymatischen Prozeß hineingezogenen Oxalationen als neutrale Kalium- oder Calciumsalze festgelegt. Bei den säurehaltigen Blättern müßte dann das nicht der Verarbeitung anheimfallende Oxalat als saures Kaliumsalz (Kleesalz) im Zellsaft gefunden werden.

Aus den Versuchen geht auch hervor, daß bei den meisten Pflanzen nicht sämtliches Oxalat verarbeitet wird. Diese Eigentümlichkeit ist für enzymatische Prozesse nichts Außergewöhnliches. Die Enzyme sind äußerst labile Gebilde, die durch die geringsten Einflüsse in ihren Wirkungen gehemmt oder sogar zerstört werden. Besonders empfindlich sind sie gegenüber Änderungen der Konzentration der Wasserstoffionen, die zum Stillstand des Prozesses führen können. In der Tat hat die Flüssigkeit während der Versuchsdauer die Menge ihrer Wasserstoffionen geändert. Am Anfang war die Lösung oft schwach sauer, während nach Abbruch des Versuchs stets eine alkalische Reaktion festgestellt werden konnte.

Nicht nur die Änderung der Wasserstoffionen-Konzentration kann auf die Verarbeitung hemmend wirken, sondern auch die entstehenden Spaltungsprodukte. Das Kohlendioxyd, sowie das Ammoniak, die bei der Verarbeitung auftreten, werden teilweise durch den Luftstrom, der durch die Versuchskolben geleitet wird, weggeführt. Es entstehen aber nicht nur diese beiden Spaltungsprodukte; denn im Blattpulver befindet sich noch ein ganzer Komplex anderer Enzyme, z. B. solche, die Kohlenhydrate, Fette und Eiweißkörper zu hydrolisieren vermögen; die Abbauprodukte aller dieser Stoffe wirken möglicherweise auf das oxalatverarbeitende Enzym schädigend ein.

Außerdem kann noch eine gegenseitige ungünstige Beeinflussung der Enzyme stattfinden und zu ihrer allmählichen Vernichtung führen. Tammann (1895) hat bei seinen Untersuchungen über das Emulsin festgestellt, daß die enzymatischen Vorgänge aus zwei untereinander eng verknüpften Prozessen bestehen: aus der eigentlichen Enzymwirkung und dem Enzymzerfall, welch letzterer besonders in wäßriger Lösung und bei

erhöhter Temperatur vor sich geht. Dieser könnte ebenfalls zum Stillstand der Verarbeitung führen. Nun ist für viele Enzyme festgestellt worden, daß die Gegenwart derjenigen Stoffe, auf die sie einwirken, ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Zerfall bedeutend erhöhen. Da aber in unseren Versuchen das Enzym stets in Gegenwart von Oxalationen arbeitet, kann nicht der Zerfall des Enzyms schuld daran sein, daß der Prozeß meist nicht zu Ende geführt wird.

Es soll aber auch nicht unerwähnt bleiben, daß durch die allgemeine Enzymtätigkeit Produkte gebildet werden, die den Prozeß beschleunigen können. Auch die verschiedenartige quantitative und qualitative Zusammensetzung der Aschenbestandteile könnte im gleichen Sinne wirken.

Aus Versuch 13, 14 und 37 Tabelle II geht hervor, daß eine weitere Ursache der verschieden starken Verarbeitung auf dem Alter der Blätter beruht. In jüngeren noch wachsenden Blättern findet im allgemeinen ein lebhafterer Stoffwechsel statt als in älteren, ausgewachsenen, und dementsprechend auch bei ersteren eine stärkere Oxalatverarbeitung.

Von den Spaltprodukten wurde nur das Kohlendioxyd bestimmt. Da in keinem Falle eine Proportionalität zwischen der verarbeiteten Oxalatmenge und der ausgeschiedenen Kohlendioxydmenge gefunden werden konnte, liegt die Vermutung nahe, daß das Kohlendioxyd nicht das einzige Produkt der Verarbeitung ist.

Über die Resultate der Tabelle II kann zusammenfassend gesagt werden, daß die Blätter der säurehaltigen wie der säurefreien Pflanzen ein Enzym besitzen, das die Oxalationen zu verarbeiten vermag.

b) Stengel und Blattstiele.

Nachdem das Vorhandensein eines die Oxalationen verarbeitenden Enzyms in den Blattspreiten, den eigentlichen Assimilationsorganen, nachgewiesen war, mußte festgestellt werden, ob ein solches auch in den vorwiegend für die Leitung der Stoffe eingerichteten Organen, den Blattstielen und Stengeln, vorhanden ist. Zu den Versuchen mußte möglichst junges, saftreiches Material verwendet werden, da alte verholzte Stengel von vornherein keine guten Resultate erwarten ließen. Die

Versuche wurden mit jungen Sprossen von Asparagus officinale und Blattstielen von Rumex maximus ausgeführt.

Zu 5,0 g Asparaguspulver wurden zugesetzt . . . . . 0,1751 g C_2O_4''
Trockenmaterial enthält kein lösliches Oxalat.
Nach 24 Stunden wurden gefunden . . . . 0,1338 g C_2O_4''
Nach 24 Stunden bei 36° verarbeitet . . . . 0,0413 g C_2O_4''
= 23,6 %

Zu 5,0 g Rumexstengelpulver wurde zugesetzt . . . . 0,2090 g C_2O_4''
5,0 g Trockenmaterial enthielt . . . . 0,2180 g C_2O_4''
Total . . . 0,4270 g C_2O_4''
Nach 24 Stunden wurden gefunden . . . . 0,1443 g C_2O_4''
Während 24 Stunden wurden bei 37° verarbeitet . . 0,2827 g C_2O_4''
= 66,2 %

Zu 5,0 g Rumexstengelpulver wurde zugesetzt . . . . 0,0937 g C_2O_4''
5,0 g Trockenmaterial enthielt . . . . 0,2180 g C_2O_4''
Total . . . 0,3117 g C_2O_4''
Nach 24 Stunden wurde gefunden . . . . 0,1096 g C_2O_4''
Während 24 Stunden wurden bei 36½° verarbeitet . 0,2021 g C_2O_4''
= 64,8 %

Diesen Versuchen ist zu entnehmen, daß die Stengel und Blattstiele die ihnen von außen zugesetzten Oxalationen zu verarbeiten vermögen. Hier ließe sich ein Versuch anschließen, der mit einer Succulenten, Mesembryanthemum linguae, ausgeführt wurde.

Zu 2,0 g getrocknetem Blattpulver wurde zugesetzt . . 0,2000 g C_2O_4''
Von 2,0 g wurden in Essigsäure gelöstes Calcium gebunden . . . . 0,854 g C_2O_4''
Rest . . . 0,1146 g C_2O_4''
Nach Abbruch des Versuchs wurde gefunden . . . 0,1043 g C_2O_4''
In 24 Stunden wurden bei 37° verarbeitet . . . . . 0,0103 g C_2O_4''
= 9,1 %

Dieser Versuch zeigt, daß auch die Succulente Mesembryanthemum die Oxalsäure verarbeiten kann. Nach der Untersuchung von Spoehr (1913) soll bei den Succulenten der Entsäuerungsprozeß nur eine photochemische Reaktion sein. Dieser Ansicht tritt aber mein Versuch entschieden entgegen, der die Verarbeitung als einen enzymatischen Prozeß erweist. Von einer Verallgemeinerung dieser Tatsache für andere Succulenten sehe ich vorderhand noch ausdrücklich ab.

c) Wurzeln.

Die Versuche wurden mit Wurzeln von Lupinus albus und von Phaseolus vulgaris durchgeführt.

Zu 1,0 g Pulver von Phaseoluswurzeln wurde zugesetzt 0,1448 g C_2O_4''
Nach dem Versuch wurde gefunden . . . . 0,0978 g C_2O_4''
In 3 Stunden wurde bei 37° verarbeitet . . . . . . 0,0470 g C_2O_4''
= 32,4 %

Zu 1,0 g Pulver von Lupinus wurde zugesetzt . . . . 0,1448 g C_2O_4''
Nach dem Versuch wurde gefunden . . . . 0,0906 g C_2O_4''
In 3 Stunden wurde bei 37° verarbeitet . . . . . . 0,0542 g C_2O_4''
= 37,4 %

Auch bei diesen Versuchen mit Wurzelpräparaten wird das zugesetzte Oxalation durch einen enzymatischen Prozeß verarbeitet.

d) Gekeimte und ungekeimte Samen.

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, daß die verschiedensten ausgewachsenen Pflanzenteile die Fähigkeit der Verarbeitung des Oxalations besitzen. Es war nun von Interesse zu untersuchen, ob auch die Samen diesen enzymatischen Prozeß durchführen können. Die ungekeimten Samen wurden

Tabelle IIIa.

Verarbeitung der Oxalationen durch Samenpulver.

Versuch	Samenpulver	Dauer der Keimung	Temp. °C	Rohproteingehalt %	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden n. 24 Std. g	C_2O_4'' Abnahme nach 24 Std. g	% der Abnahme	Kohlendioxydmenge mg	Differenz d. Abbaus ungek. u. gekeimt. Samen %
8	Lupinus albus . . .	4 Tage	35	—	0,1607	0,1159	0,0448	27,9	33,5	— 3,0
1	„ „ . . .	ungek.	35	44,48	0,1650	0,1139	0,0511	30,9	48,9	
11	Glycine Soya	6 Tage	36	—	0,1639	0,1087	0,0552	33,7	120,1	+ 8,9
2	„ „	ungek.	37	38,44	0,1642	0,1232	0,0410	24,9	67,9	
10	Vicia Faba L. . . .	3 Tage	36	—	0,1640	0,1300	0,0[illegible]40	20,7	52,0	+ 8,1
3	„ „	ungek.	36	22,81	0,1650	0,1441	0,0209	12,6	52,1	
101	Pisum sativum L. . .	8 Tage	3[illegible]	—	0,1590	0,0594	0,0996	58,3	n. bestimmt	+ 40,1
5	„ „ . .	ungek.	36	21,50	0,1642	0,1322	0,0300	18,2	163,4	
9	Triticum vulgare . .	4 Tage	36	—	0,1597	0,1276	0,0321	20,1	37,2	± 0
6	„ „ . .	ungek.	36	13,9	0,1625	0,1298	0,0327	20,1	46,4	
111	Avena sativa L. . . .	6 Tage	36	—	0,1874	0,0695	0,1179	62,9	n. bestimmt	+ 37,6
196	„ „ . . .	ungek.	37	13,1	0,2090	0,1561	0,0539	25,3	n. bestimmt	
106	Hordeum vulgare L. .	5 Tage	36	—	0,1565	0,1003	0,0562	35,9	n. bestimmt	+ 4,8
197	„ „ .	ungek.	37	12,56	0,2090	0,1439	0,0651	31,1	n. bestimmt	
112	Secale cereale Vill. .	5 Tage	36	—	0,1339	0,0677	0,0662	49,4	n. bestimmt	+ 27,7
198	„ „ „ . .	ungek.	37	12,48	0,2090	0,1536	0,0454	21,7	n. bestimmt	
81	Fagopyrum esculentum Mönch	6 Tage	36	—	0,1800	0,0739	0,1061	57,7	167,4	+ 21,4
113	Desgl.	ungek.	36	11,66	0,1590	0,1012	0,0578	36,3	n. bestimmt	
30	Zea mais L.	5 Tage	36	—	0,1791	0,0748	0,1053	58,1	48,6	+ 8,9
102	„ „	ungek.	37	10,91	0,1594	0,0810	0,0784	49,2	n. bestimmt	

ohne jede Vorbehandlung zur Darstellung eines Enzympräparates verwendet. Die zur Keimung bestimmten Samen wurden in Wasser bei 25° im Thermostaten während 24 Stunden zur Quellung gebracht; dann kamen sie in einen feuchten Raum des Dunkelzimmers und blieben dort so lange, bis die Wurzeln der Dicotylensamen resp. die Koleoptile der Gramineen die Länge von 1 cm erreicht hatten. Dann wurde nach dem auf S. 9 ausgeführten Verfahren das Trockenpräparat dargestellt.

Zu den Versuchen wurde 5,0 g getrocknetes Samenpulver mit ungefähr 1/2%iger Ammoniumoxalatlösung gemengt. Versuchsdauer 24 Stunden; pro Kolben und Stunde wurde 1 1/2 l kohlendioxydfreie Luft durchgeleitet.

Aus den Versuchen ergibt sich, daß die gekeimten und ungekeimten Samen die ihnen von außen gebotenen Oxalationen zu verarbeiten imstande sind. Die Verarbeitung ist bei den gekeimten im allgemeinen energischer als bei den ungekeimten Samen. Dies hängt offenbar mit dem Keimungsprozeß zusammen, durch den der latente Stoffwechsel des ruhenden Samens angeregt und die Produktion von Enzymen gesteigert wird. Diese formen die Reservestoffe, welche im Samen abgelagert sind, so um, daß sie für den Aufbau des Keimlings ausgenutzt werden können.

Wenn ich nun aus Tabelle IIIa die von gleichaltrigen Stadien der verschiedenen Versuchspflanzen verarbeitete Oxalatmenge zusammenstelle und daraus die mittleren Werte berechne, so erhalte ich Tabelle IIIb.

Tabelle IIIb.

	Ungekeimte Samen	Gekeimte Samen (Alter in Tagen)				
		3	4	5	6	8
	%	%	%	%	%	%
Mittel aus der verarbeiteten C_2O_4'' in %	27	21	24	47	52	58

Obwohl die Versuchspflanzen sehr verschiedenartig sind und deshalb die Zahlen nur Annäherungswerte repräsentieren, darf aus ihnen doch der Schluß gezogen werden, daß die älteren Keimlinge die Oxalsäure stärker verarbeiten als die jüngeren, und ferner, daß die ungekeimten Samen im allgemeinen stärker arbeiten als die 3- und 4tägigen Keimlinge

Eine Ausnahme machen Lupinus albus und Triticum vulgare; bei ersterem ist die Verarbeitung im gekeimten Samen schwächer als im ungekeimten; bei letzterem konnte in der Wirkungsweise der aus gekeimten und ungekeimten Samen hergestellten Präparate kein Unterschied festgestellt werden. Die oben angeführten Resultate stehen zwar auf schwacher Grundlage, da zu wenig Tatsachen vorliegen. Doch ist die Möglichkeit vorhanden, dieselben mit den Palladinschen Ergebnissen in Beziehung zu bringen. Dieser Forscher (1896) hat nämlich gefunden, daß während der Keimung des Weizens und der Lupine die Nucleoproteide, die er mit dem Protoplasma identifiziert, nach anfänglicher Abnahme wieder zunehmen. Dies würde die schwächere Verarbeitung der Oxalsäure bei den 3- und 4tägigen Keimlingen einigermaßen erklären. Der Einfluß der Gesamteiweißmenge auf den Abbau der Oxalsäure ist zweifelhaft.

e) Farblose Blumenblätter.

Die weißen Blumenblätter einer kultivierten Pensée-Racé (Viola) führten zu folgendem Resultat:

Zu 5,0 g trockenem Pulver zugesetzt: 0,1874 g C_2O_4''
Nach 24 Stunden gefunden . . . . . 0,0800 g C_2O_4''
0,1074 g C_2O_4''
folglich verarbeitet: 57,3 %.

f) Verschiedene Organe normal gewachsener Lupinen.

20 Samen von Lupinus albus wurden am 16. V. 18 während 24 Stunden in Wasser von 25° zur Quellung veranlaßt, am 27. V. 18 in groben Sand gesetzt und täglich mit 0,1 %iger Öhlmannscher Nährlösung begossen. Am 18. VI. 18 wurden die Pflanzen zum Trocknen geerntet und pulverisiert. 1,0 g der getrockneten Pulver wurde mit 50 ccm ½ %iger Ammoniumoxalatlösung gemischt und der Versuch während 3 Stunden wie üblich durchgeführt; Temperatur 37°.

Tabelle IV.
Verschiedene Organe normal gewachsener Lupinen.

Vers.	Verwendetes Pflanzenorgan	frisch gewogen g	luft-trocken gewogen g	%	C_2O_4'' zuges. g	C_2O_4'' gef. g	C_2O_4'' Abn. g	Abn. %
184	Wurzel	16,70	1,3	7,9	0,1448	0,0906	0,0542	37,4
185	Kotyledonen .	51,32	5,35	9,8	0,1448	0,0981	0,0467	32,2
186	Stengel	37,15	2,81	7,6	0,1448	0,0669	0,0779	53.8
187	Blätter	17,91	2,51	13,9	0,1448	0,0893	0,0555	37,3

Die Verschiedenheit in der Menge des verarbeiteten Oxalations kommt deutlich zum Ausdruck, indem die Kotyledonen am wenigsten, die Blätter und Wurzeln etwas mehr und der Stengel weitaus am stärksten arbeiten. Diese Eigentümlichkeit hängt offenbar mit dem regeren oder trägeren Stoffwechsel der einzelnen Organe zusammen.

C. Verarbeitung des Oxalations durch etiolierte Pflanzen.

Bis jetzt haben wir normal entwickelte Pflanzenorgane auf die Oxalatverarbeitung hin untersucht. Wie sich Pflanzenorgane, die unter Lichtabschluß gewachsen sind, in dieser Hinsicht verhalten, soll im folgenden untersucht werden.

20 Samen von Phaseolus vulgaris wurden am 4. V. 18 nach 24stündigem Quellen bei 25° in Töpfe mit guter Lauberde gesetzt und bis zum 7. VI. 18 bei einer Temperatur von 18 bis 20° im Dunkelkasten gelassen. Die Pflanzen etiolierten und bildeten lange Stengel und kleine, gelbe, runzelige Blätter. Nach ungefähr 4wöchigem Aufenthalt im Dunkeln wurden sie getrocknet und pulverisiert. Bei den Versuchen wurde 1,0 g getrocknetes Organpulver verwendet, zu dem 50 ccm ½%ige Ammoniumoxalatlösung zugesetzt wurde. Im übrigen stimmte die Versuchsanordnung mit der bei grünen Pflanzen angewendeten genau überein. Die Versuche wurden bei 37° ausgeführt und dauerten 3 Stunden, bei Solanum 24 Stunden bei 36°.

Tabelle V.

Verschiedene Organe etiolierter Pflanzen.

Vers.	Verwendetes Organ	frisch gewogen g	lufttrocken gewogen g	%	C_2O_4'' zuges. g	C_2O_4'' gef. g	C_2O_4'' Abn. g	Abn. %
180	Phaseol.-Wurzel	40,21	2,51	6,2	0,1448	0,0978	0,0470	32,4
181	„ -Kotyledonen	50,20	7,35	14,6	0,1448	0,1043	0,0405	27,9
182	„ -Stengel . .	315,22	25,22	8,0	0,1448	0,0854	0,0594	41,0
183	„ -Blätter . .	10,10	1,51	14,9	0,1448	0,0612	0,0836	57,7
	Solanum tuberosum-Stengel	320,5	30,6	9,5	0,1874	0,0634	0,1240	66,1

Die Versuche ergeben, daß auch die etiolierten Pflanzen die ihnen zugesetzten Oxalationen zu verarbeiten vermögen, und zwar ihre verschiedenen Organe in verschiedenem Maße. Die Blätter verarbeiten das Oxalation am stärksten, die Stengel und Wurzeln nehmen eine Mittelstellung ein, während die Kotyledonen die geringste Abnahme des Oxalats aufweisen. Dies

ist vielleicht auf die in den Kotyledonen gespeicherten Reserveproteine zurückzuführen, die möglicherweise das Enzym z. T. adsorbieren und nicht zur Wirkung kommen lassen. Dieses verschiedene Verhalten der einzelnen Organe in bezug auf die Verarbeitung des Oxalations wurde auch bei der normal entwickelten Lupinuspflanze beobachtet (vgl. S. 21).

Obwohl zu den mit grünen und etiolierten Individuen ausgeführten Versuchen verschiedene Pflanzenarten verwendet wurden, so ist doch zu erkennen (Tabelle IV und V), daß die grünen Pflanzenteile in der Verarbeitung des Oxalations den etiolierten überlegen sind; eine Ausnahme machen nur die Blätter.

Um festzustellen, ob dieses auffallende Resultat nur auf die Verschiedenheit der untersuchten Spezies oder auf den verschiedenen Zustand der Pflanzen zurückzuführen ist, habe ich folgenden Versuch mit Phaseolus ausgeführt:

Es wurden 4 Wochen alte Blätter von Phaseolus, die im Gewächshaus wuchsen, getrocknet und die Wirkung des daraus gewonnenen Pulvers mit demjenigen etiolierter Pflanzen verglichen.

Vers.	Phaseolus-Blätter	frisch gewogen g	lufttrocken gewogen g	%	In 100 Tl. Frischgew. Eiweißstoffe nach Palladin %
183	etioliert	10,10	1,51	14,9	8,38
190	grün	95,10	11,10	11,6	4,95

Vers.	Phaseolus-Blätter	Menge d. Blattpulvers g	Temperatur °C	Dauer d. Vers. Std.	C_2O_4'' gegeben g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4'' Abnahme g	%
183	etioliert .	1,0	37	3	0,1448	0,0612	0,0836	57,7
190	grün . .	1,0	37	3	0,1448	0,0431	0,1017	70,2

Dieser Versuch zeigt, daß das normale Blatt die Oxalationen stärker abzubauen vermag als das etiolierte, und daß der in Tabelle IV und V enthaltene Widerspruch durch die Verschiedenheit der verwendeten Spezies bedingt ist.

Wenn wir den Eiweißgehalt der grünen mit demjenigen

der etiolierten Blätter an Hand von Palladins (1891) Angaben vergleichen, so zeigt sich, daß die etiolierten Blätter eiweißreicher sind als die grünen.

Man sollte nun erwarten, daß das eiweißreichere Organ dem eiweißärmeren in der enzymatischen Leistung überlegen sei, weil die plasmareiche Zelle mehr Enzym zu bilden vermag als die plasmaarme. Dies scheint bei den etiolierten Phaseolusblättern nicht zuzutreffen, doch kann ihr Verhalten durch einen anderen Befund Palladins (1892) wenigstens zum Teil erklärt werden. Er fand nämlich, daß die Blätter normaler grüner Phaseoluspflanzen aschenreicher sind als die der etiolierten; besonders stellte er starke Unterschiede im Kalium-, Calcium- und Eisengehalt fest. Daß anorganische Ionen enzymatische Reaktionen beschleunigen, ist bekannt. Nach den Untersuchungen von A. Bach (1910) wären den Metallsalzen, speziell dem Mangan und dem Eisen bei oxydierenden Enzymen die Rolle von Aktivatoren zuzuschreiben, und Stoklasa (1916) konnte bei seinen Atmungsversuchen an der Zuckerrübe feststellen, daß das Kaliumion für die Mechanik der physiologischen Verbrennung in chlorophyllhaltigen und chlorophyllfreien Zellen unentbehrlich sei.

Ich lasse eine kleine Tabelle folgen, in der ich den Aschengehalt der grünen und etiolierten Phaseolusblätter nach Palladins (1911) Pflanzenphysiologie zusammengestellt habe.

Tabelle VI.

Aschengehalt grüner und etiolierter Phaseolusblätter.

Reinasche auf 1000 g	K_2O	CaO	MgO	Fe_2O_3	P_2O_5	SO_3	SiO_2
grün 103,0 g . . .	44,9	13,3	6,6	1,1	21,9	8,3	5,6
etioliert 75,4 g . . .	34,5	2,6	4,0	0,3	32,5	1,2	6,6

Die stärkere Oxalatverarbeitung durch Pulver aus grünen Blättern braucht allerdings nicht allein auf dem höheren Aschengehalt und dessen verschiedener quantitativer und qualitativer Zusammensetzung zu beruhen. Denn es ist nicht außer acht zu lassen, daß durch die abnormen Wachstumsbedingungen der etiolierten Pflanzen das Protoplasma und dessen gesamter Stoffwechsel sehr ungünstig beeinflußt wird. In Verbindung damit erfahren auch die enzymatischen Prozesse im allgemeinen und

der Abbau des Oxalations im besonderen eine Verschiebung zu Ungunsten der etiolierten gegenüber dem der normalen Pflanze.

D. Verarbeitung des Oxalations durch Preßsaft und Enzympulver.

a) Preßsaft.

Die Versuche mit Blattpulver von Helianthus annuus haben gezeigt, daß dieser die Oxalationen energisch verarbeitet. Es war deshalb zu erwarten, daß Helianthus ein günstiges Objekt zur Gewinnung eines reineren Enzympräparates sei. Zu diesem Zwecke wurde ein Kilogramm frischer Helianthusblätter gesammelt und die Blattmasse mittels einer Fleischhackmaschine zerkleinert. Da durch das bloße Zerhacken die Zellen der Blätter nur wenig verletzt werden, so daß nur eine verhältnismäßig geringe Menge des Zellinhaltes gewonnen worden wäre, habe ich mit Hilfe von sterilem Quarzsand, den ich portionenweise dem Blätterbrei zusetzte, die Masse in einer Reibschale zerrieben und dadurch die Ausbeute an gelöstem Zellinhalt erhöht. Dieser Brei wurde in ein starkes Leinentuch eingehüllt und unter dem Druck einer Ölpresse von 300 Atmosphären ausgepreßt. Der Preßsaft wurde in einem sterilen Kolben aufgefangen. 1 kg Blätter lieferte 680 ccm Saft, der leicht gelb gefärbt, aber klar war und neutral reagierte. Er enthielt koagulierbares Eiweiß, was aus dem beim Erhitzen einer Probe entstehenden Niederschlag, welcher Eiweißreaktion zeigte, geschlossen werden muß.

Einen Teil des Preßsaftes habe ich sofort zu Versuchen verwendet, um seine Wirksamkeit in bezug auf die Verarbeitung des Oxalations kennen zu lernen.

Zu diesem Zwecke wurde in den Versuchskolben eine bestimmte Ammoniumoxalatmenge abgewogen und mit der Pipette 25 ccm des Preßsaftes, eventuell noch 25 ccm dest. Wasser, sowie 2 ccm Toluol zugesetzt.

Die Versuchsanordnung und der Analysengang war derselbe wie bei den mit Blattpulvern ausgeführten Versuchen. Temperatur 36°, Dauer 24 Stunden. Die Resultate sind in Tabelle VII zusammengestellt.

Tabelle VII.

Versuch	Zusatz zum Preßsaft	Zugesetzt g	Gefunden g	Abnahme g	%	Reaktion d. Med. v. Vers.	n. Vers.
73	25 ccm ohne Zusatz	0,2111	0,1140	0,0971	46,0	neutr.	alkal.
74	25 ccm + 25 ccm aq. dest.	0,2320	0,0916	0,1404	60,4	„	„
75	25 ccm + 25 ccm aq. dest.	0,2520	0,0990	0,1530	60,7	„	„
76	Kontrolle	0,2435	0,2431[1]	—	—	„	neutr.

Die Versuche zeigen zur Evidenz, daß der Preßsaft von Helianthus eine starke oxalatverarbeitende Wirkung besitzt, und daß die Verarbeitung von der Konzentration des Oxalats abhängt, indem bei höherer Konzentration des Oxalats (Versuch 73) eine geringere Abnahme stattfindet als bei niedrigerer Konzentration (Versuch 74 und 75).

Der Preßsaft verarbeitet das zugesetzte Oxalat nicht so prompt, wie das Blattpulver von Helianthus; nach 24 stündiger Versuchsdauer hat ersterer nur 60 %, letzterer aber alles Oxalat verarbeitet.

Die 25 ccm Preßsaft entsprechen nicht den 5,0 g trockenen Blattpulvers, was aus folgender Berechnung hervorgeht.

1000	g	frischer Blätter	geben	680	ccm	Preßsaft	
1	g	„	„	„	0,68	„	„
317	g	„	„	sind	59,1	g	trockene Blätter
18,5	g trockene	„	„	100,0	g	frische	„
5,0	g	„	„	„	27,0	g	„ „

Die 27,0 g frische Blätter geben nur 18,36 ccm Preßsaft. Die 25 ccm des Preßsaftes entsprechen ungefähr 6,6 g trockenen Blattpulvers; trotzdem bleibt die Wirksamkeit des Preßsaftes hinter dem des Blattpulvers zurück, von welchem 5 g unter gleichen Bedingungen sämtliche Oxalationen verarbeiteten.

Wie ich auf S. 16 hervorgehoben habe, übt eine Änderung der Wasserstoffionen-Konzentration auf die Enzyme eine schädigende Wirkung aus. Wie aber Rosenthaler (1910)

[1]) Kontrolle ausgeführt, um den durch das Krystallwasser des Ammoniumoxalats verursachten Fehler zu ermitteln.

gezeigt hat, sind Kolloide, speziell Eiweißstoffe, imstande, die Enzyme gegen die Schädigung der Wasserstoffionen zu schützen. Da nun das Blattpulver mehr Kolloide enthält (Cellulose, unlösliche Eiweißstoffe) als der Preßsaft, so kann dessen geringere Leistung auf die geringere Menge der darin enthaltenen Schutzkolloide zurückgeführt werden.

b) Enzympulver.

Der Rest des Preßsaftes wurde mit $3^1/_2$ Liter $95^0/_0$igem Alkohol gefällt; es bildete sich rasch ein voluminöser Niederschlag, der sehr bald eine braune Färbung annahm. Dieser Niederschlag wurde möglichst rasch abfiltriert, in dünner Schicht auf sterile Glasplatten gestrichen und im Trockenschrank bei 40^0 getrocknet. Die trockene Masse wurde in einer Reibschale fein zerrieben und gab ein braunes Pulver. Die Ausbeute betrug 18 g. Von einer weiteren Reinigung wurde abgesehen, weil eine solche mit erheblichen Verlusten verbunden ist. Das Präparat wurde in einem Calciumchloridexsiccator im Dunkeln aufbewahrt.

Wegen äußerer Umstände konnte es erst am 13. Dezember 1917, 3 Monate nach seiner Darstellung, zu Versuchen verwendet werden; ihre Ergebnisse sind in Tabelle VIII zusammengestellt; Temperatur 36^0.

Tabelle VIII.

Versuch	Datum des Versuchs	Enzymmenge g	Dauer des Vers. Std.	Ammoniumoxalat zugesetzt g	Ammoniumoxalat gefunden g	Ammoniumoxalat Abnahme g	Ammoniumoxalat $^0/_0$	Reaktion d. Med. vor Vers.	Reaktion d. Med. nach Vers.
140	3. XII. 17	0,3593	12	0,1571	0,0744	0,0827	52,6	sauer	sauer
141	13. XII. 17	0,4277	24	0,1588	0,0704	0,0884	55,6	„	„
146	27. V. 18	0,1500	24	0,1872	0,1184	0,0688	36,7	„	alkal.

Durch die Alkoholfällung des Preßsaftes erhalten wir ein Pulver, das die zugesetzten Oxalationen zu verarbeiten vermag, allerdings nicht so intensiv wie das Blattpulverpräparat, obwohl die Enzymmenge der Blattpulvermenge annähernd entspricht:

Aus 1000 g frischen Blättern wurden 18 g Pulver erhalten,
„ 1 g „ „ „ 0,018 g „ „
5 g trockener Blätter sind 27,0 g frische Blätter;
aus diesen wurden $27{,}0 \times 0{,}018 = 0{,}4860$ g Pulver gewonnen.

Der Unterschied in der Wirksamkeit des Enzympräparats im Vergleich zu demjenigen des Blattpulvers kann dadurch bedingt sein, daß während des Fällens und Abfiltrierens des Niederschlags der Alkohol eine Schädigung auf das Enzym ausgeübt hat. Außerdem kann die Konzentration der Oxalationen für das isolierte Enzym ungünstiger sein als für das im Blattpulver enthaltene. Endlich könnte der saure Charakter des Enzympräparates auf den Prozeß ungünstig einwirken.

Im dritten Versuch, der erst 5 Monate nach den beiden ersten ausgeführt wurde, war die Konzentration des Oxalats ungefähr dieselbe wie in den beiden ersteren, die Konzentration des Enzyms dagegen halb so hoch. Wie ich auf S. 37 zeigen werde, nimmt die Verarbeitung des Oxalats nicht proportional, sondern nur mit der Quadratwurzel der Enzymmenge zu. Diese Gesetzmäßigkeit (Schützsche Regel) auf unseren Versuch angewendet ergibt, daß das Enzympräparat theoretisch 39 % des zugesetzten Oxalats hätte verarbeiten sollen. Da es in Wirklichkeit nur etwas weniger, d. h. 36,7 % verarbeitete, hat es in 5 Monaten von seiner Wirksamkeit sozusagen nichts eingebüßt.

E. Kinetik der Oxalatverarbeitung.

Die bisherigen Ergebnisse meiner Untersuchungen beweisen, daß die Verarbeitung des Oxalations bei allen untersuchten Pflanzen ein enzymatischer Prozeß ist.

In den folgenden Ausführungen soll festgestellt werden, welchen allgemeinen Gesetzen der Enzymreaktionen die Oxalatverarbeitung unterworfen ist.

a) Einfluß der Temperatur.

Einfluß hoher Temperatur auf die Existenz der Enzyme.

Als Beweis für die enzymatische Natur der Verarbeitung der Oxalsäure, wie für das Vorhandensein eines Enzyms überhaupt, gilt allgemein die Tatsache, daß die organischen Katalysatoren (Enzyme) durch hohe Temperatur (100°) vernichtet werden. Diese Zerstörung kann mit der Eiweißnatur des Enzyms in Zusammenhang stehen. Ich habe bei Rumex acetosa und Helianthus annuus Versuche in dieser Richtung angestellt.

Eine Probe des trockenen Blattpulvers beider Pflanzen wurde während einer Stunde im Trockenschrank auf 120° erhitzt und dann abgekühlt zum Versuch verwendet. Eine andere Probe des Blattpulvers wurde in Wasser 5 Minuten zum Sieden erhitzt (Temperatur 98°).

Die Resultate dieser Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt; Dauer 24 Stunden.

Tabelle IX.

Versuch	Vorbehandlung Temp. °C	Vorbehandlung Dauer	Menge des Blattpulvers g	C_2O_4'' im Blattpulver g	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	Abnahme %
	Rumex (Temperatur 35°).						
49	Keine Vorbehandl.		5,0	0,0513	0,1768	0,0524	77,0
50	120	1 Std.	5,0	0,0513	0,1782	0,1091	52,4
121	98	5 Min.	5,0	0,0513	0,1527	0,1399	31,4
	Helianthus (Temperatur 30°).						
120	Keine Vorbehandl.		2,0	—	0,1527	0,1527	100
122	120	1 Std.	2,0	—	0,2566	0,0696	27,1
119	98	5 Min.	2,0	—	0,1234	0,1234	0

Aus den Versuchen Nr. 50 und 122 geht hervor, daß ein 1 stündiges trockenes Erhitzen der Blattpulver nur eine Schädigung, nicht aber die völlige Aufhebung der Wirksamkeit der Präparate zur Folge hat. Nehmen wir nun an, daß während der zu Beginn der Vorbehandlung einsetzenden allmählichen Temperatursteigerung die im Blattpulver von Rumex enthaltenen 0,0513 g löslichen Oxalate verarbeitet wurden, so folgt, daß von den 0,1782 g zugesetzten Oxalats nur 37,9% verarbeitet wurden, während im Kontrollversuch ohne jede Vorbehandlung 77,0% der Oxalationen der Verarbeitung anheimgefallen sind. Beim Helianthusblattpulver, in dem kein lösliches Oxalat festgestellt werden konnte, erreichte die Verarbeitung des auf 120° erhitzten trockenen Blattpulvers bloß den Wert von 27,1%, während in der Kontrolle kein Oxalat mehr festgestellt werden konnte. Die enzymatische Leistung des auf 120° erhitzten Blattpulvers von Rumex ist auf die Hälfte gesunken, bei Helianthus hat sie sogar um das $^3/_4$ fache abgenommen. Im trockenen Zustand ist somit das Enzym

gegen Erhitzen sehr resistent, was übrigens schon auf S. 11 gezeigt wurde. Die in Gegenwart von Wasser auf 98° erhitzten Präparate, Versuch Nr. 121 und 119, haben von ihrer Wirksamkeit bedeutend mehr eingebüßt oder sie sogar ganz verloren. Auch hier ist die Vermutung berechtigt, daß die im Blattpulver von Rumex enthaltenen löslichen Oxalate der enzymatischen Verarbeitung anheimgefallen sind; trotzdem sind von den zugesetzten Oxalationen 0,0128 g = 8,4 % verarbeitet worden.

Im Helianthusblattpulver, in dem keine löslichen Oxalate gefunden wurden, hat das Kochen des Blattpulvers das Enzym vollständig zerstört. Das verschiedene Verhalten des Rumex- und Helianthusblattpulvers nach der Behandlung mit feuchter Hitze könnte damit erklärt werden, daß die bei Rumex vorhandenen löslichen Oxalate das Enzym vor der Zerstörung durch Siedehitze schützen, während bei Helianthus, dem die löslichen Oxalate fehlen, bei dem also eine solche Schutzwirkung ausgeschlossen ist, das Enzym im kochenden Wasser seine Wirksamkeit einbüßt.

Einfluß verschiedener Temperatur auf die Verarbeitung des Oxalations.

Die Versuche, die die Abhängigkeit von Temperatur und enzymatischer Verarbeitung des Oxalations klarlegen sollen, wurden mit Rumex acetosa, und zwar folgendermaßen ausgeführt:

In die Versuchskolben wurde eine abpipettierte Menge Ammoniumoxalat gebracht und die Kolben eine halbe Stunde im Wasserbad auf die gewünschte Temperatur vorerwärmt, so daß die Ammoniumoxalatlösung die Temperatur des Wasserbades annahm. Darauf wurde 1,0 g des Rumexblattpulvers zugesetzt, das Zimmertemperatur hatte. Dadurch wurden die Temperaturen über 30° zunächst um 1 bis 2° herabgesetzt; nach 2 Minuten jedoch war der Ausgleich zwischen der Temperatur des Wasserbades und des Versuchskolbens schon vollzogen. Bei niederen Versuchstemperaturen (0 und 10°) stiegen diese beim Einführen des Blattpulvers zunächst um 2 bis 5°; es dauerte 2 bis 5 Minuten, bis der Ausgleich der beiden Temperaturen stattgefunden hatte. Bei diesen Versuchen habe ich die Kolben nicht durchlüftet, um bei allen Temperaturen in bezug auf Wegführung von Ammoniak, Kohlendioxyd und Wasserdampf möglichst konstante Bedingungen zu haben. Die Versuche dauerten 2 Stunden. Vergl. Fig. 1.

Tabelle X.

Temp. °C	Temp. im Wasserbad °C	Temp. im Kolben °C	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4'' Abnahme g	Abnahme %
29	Kontrolle	—	0,1887	0,1886	—	—
0	Eis 0	0	0,1887	0,1848	0,0039	2,07
10	10	10	0,1887	0,1707	0,0180	9,5
20	20	20	0,1887	0,1571	0,0316	16,7
30	30	30	0,1887	0,1386	0,0501	26,5
40	40,5	40	0,1887	0,1518	0,0369	19,6
50	50,5	50	0,1887	0,1738	0,0149	7,9
60	60,5 [1])	60	0,1887	0,1769	0,0118	6,2
70	71,0	70	0,1887	0,1826	0,0061	3,2

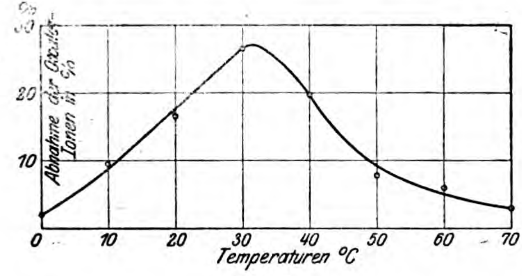


Fig. 1.

Der Tabelle X und der Kurve (Fig. 1) ist zu entnehmen, daß bei 0° eine Verarbeitung stattfindet; diese kann einerseits durch das beim Einbringen des Blattpulvers erfolgte Ansteigen der Temperatur um 5° bedingt sein, andererseits durch den 5 Minuten langen Ausgleich der Temperatur. Von 0° steigt die Verarbeitung mit der Temperatur bis über 30°, um gegen 40 und 50° stark abzufallen. Auch bei 60 und 70° findet noch Verarbeitung statt. Diese kann durch die Gegenwart der Oxalationen ermöglicht worden sein, die, wie wir sahen (S. 30), das Enzym wahrscheinlich schützen.

Das Optimum der Oxalatverarbeitung liegt somit bei Rumex zwischen 30 und 40°. Da die Enzyme Katalysatoren sind, so ist zu erwarten, daß einer Steigerung der Temperatur eine Steigerung der Enzymtätigkeit parallel geht. Die Proportionalität zwischen Temperaturerhöhung und Verarbeitung des

[1]) Bei höheren Temperaturen mußte die Wasserbadtemperatur etwas höher gehalten werden, um im Versuchskolben Konstanz zu haben.

Oxalats besteht aber nur bis zu einer bestimmten Grenze. Wird die Temperatur über diese hinaus gesteigert, so nimmt die Verarbeitung ab.

Dies ist durch zwei Prozesse bedingt: Die Temperatursteigerung führt zu einer Beschleunigung der Verarbeitung, jedoch auch zum Zerfall des Enzyms (Tammann 1895); dieser ist bei niederen Temperaturen sehr gering, wird aber bei steigender Temperatur stark beschleunigt. Solange die Beschleunigung der Enzymtätigkeit vorherrscht, nimmt die Verarbeitung des Oxalats zu; wenn aber der Enzymzerfall die Enzymwirkung überwiegt, beginnt die Verarbeitung abzunehmen. Das Resultat der Superposition dieser beiden Vorgänge ist das Optimum.

Außer der längeren Einwirkung der höheren Temperatur selbst führt eventuell auch die durch die erhöhte Temperatur bewirkte stärkere Dissoziation der Produkte der Enzymwirkung (Kohlendioxyd, Ammoniak usw.), die in diesen Versuchen nicht weggeführt werden konnten, zur Abnahme der Verarbeitung.

Der Temperaturkoeffizient.

Für chemische Reaktionen wurde festgestellt, daß bei einer Temperatursteigerung um 10° die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt oder gar verdreifacht wird. Diese Gesetzmäßigkeit ist von Kanitz (1915) als Reaktionsgeschwindigkeit-Temperaturregel oder R.-G.-T.-Regel bezeichnet worden; sie ist auch unter dem Namen van t'Hoffsche Regel bekannt.

Um diese R.-G.-T.-Regel in unserem Versuch mit Rumex zu prüfen, müssen wir die Geschwindigkeitskonstanten K der verschiedenen Temperaturen berechnen. Die K-Werte werden nach der Gleichung (Höber 1914, und Bayliss 1910):

$$K = \frac{1}{t} \log \text{nat} \frac{a}{a - x}$$

ermittelt.

In dieser Gleichung bedeutet a die Anfangskonzentration des Oxalations, x die während der Zeit t (in unserem Versuche 2 Stunden) verarbeitete Oxalationenmenge. Wenn die K-Werte rechnerisch bekannt sind, erhält man den Quotienten (Q_{10}) durch Division der Geschwindigkeitskonstanten der um 10° höheren Temperatur ($K_t + 10$) durch die

Konstante der niederen Temqeratur (K_t). Man bezeichnet ihn als Temperaturkoeffizienten oder Temperaturquotienten (Q_{10}).

$$Q_{10} = \frac{K_t + 10}{K_t}$$

(s. Kanitz 1915, S. 9).

Temp. °C	a g	x g	$K = \frac{1}{t} \log \text{nat} \frac{a}{a-x}$	°C	Q_{10}
0	0,1887	0,0039	0,01048	0—10	4,78
10	0,1887	0,0180	0,05013	10—20	1,83
20	0,1887	0,0316	0,09172	20—30	1,688
30	0,1887	0,0501	0,15429	30—40	0,7053
40	0,1887	0,0369	0,10881	40—50	0,378
50	0,1887	0,0149	0,04113	50—60	0,792
60	0,1887	0,0119	0,03257	60—70	0,504
70	0,1887	0,0061	0,01643		

Die Geschwindigkeitskonstanten K steigen bis 30° an, um nachher wieder stark abzufallen. Der Temperaturkoeffizient ist nirgends konstant, sondern sehr variabel. Er erreicht nirgends den theoretischen Wert von 2 oder 3. Dieser Unterschied zwischen theoretischen und wirklich erhaltenen Werten kommt auch bei anderen enzymatischen Prozessen vor. Slator (1906), der bei der alkoholischen Gärung den Temperaturquotienten für kleinere Zeitintervalle bestimmte, fand ebenfalls sehr stark schwankende Werte (7,0; 4,5; 3,3; 2,5 usw.).

Diese Abweichungen vom theoretischen Wert können bei enzymatischen Prozessen durch die Heterogenität des Mediums bedingt sein.

b) Einfluß des Sauerstoffs auf die Verarbeitung.

Aus den Untersuchungen von Mayer (1878), Kraus (1886 b), de Vries (1885), Gerber (1896) und Warburg (1886) geht hervor, daß die Lichtentsäuerung der Succulenten an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden ist. Auch Bassalik (1917) fand, daß bei Rumex die Verarbeitung des Oxalations von der Sauerstoffzufuhr abhängt. Zur Feststellung der Abhängigkeit der Oxalatverarbeitung von der Sauerstoffzufuhr leitete ich durch die Versuchskolben innerhalb der Versuchsdauer (2 Stunden) verschiedene Luftmengen und bestimmte nachher die Verarbeitung des Oxalations; Temperatur 37°.

Tabelle XI.

Versuch	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4'' Abnahme g	Abnahme %	Luftmenge pro Kolben und Stunde
7	0,5000	0,4453	0,0547	10,9	200 ccm
8	0,5000	0,4140	0,0860	17,2	1 Liter
9	0,5000	0,3920	0,1080	21,6	2 „
10	0,5000	0,3735	0,1265	25,3	10 „
4[1])	0,5000	0,3727	0,1273	25,5	10 „
11	0,5000	0,3964	0,1036	20,7	20 „
12	0,5000	0,3973	0,1027	20,5	50 „

Diese Versuchsserie (s. Tabelle XI) zeigt deutlich, daß, je mehr Luft durch den Versuchskolben gesogen, desto mehr Oxalat verarbeitet wird. Allerdings darf man die Durchlüftung nicht allzusehr steigern (wie Versuche 11 und 12 zeigen), denn mit immer wachsender Durchlüftung beginnt die Verarbeitung wieder abzunehmen. Diese Erscheinung kann dadurch bedingt sein, daß von der großen Menge Luft, die durch den Versuchskolben gesogen wird, der im Kolben befindliche Wasserdampf stets fortgeführt und außerdem solcher stets von neuem gebildet wird, was eine Steigerung der Konzentration zur Folge hat. Ferner bildet sich bei der starken Durchlüftung im Versuchskolben Schaum, in den ein Teil des Enzyms konzentriert und zugleich inaktiviert wird; diese Erscheinung bezeichnet man als Schüttelinaktivierung (C. Oppenheimer 1910).

Im Hinblick auf die Tatsache, daß die Verarbeitung von einer mäßig gesteigerten Sauerstoffzufuhr begünstigt wird, habe ich die Enzymtätigkeit auch in einer Wasserstoffatmosphäre untersucht.

Zu den Versuchen wurden Wulffsche Flaschen benutzt. In die drei Öffnungen einer solchen Flasche wurde ein Zuleitungsrohr, ein Ableitungsrohr und ein Trichter eingefügt; die Öffnungen wurden mit Kautschukpfropfen verschlossen. In die Kolben wurde vor dem Versuch je 1,0 g getrocknetes Rumexblattpulver und 0,1390 g Ammoniumoxalat gebracht. Darauf wurden die Kolben im Vakuum leergepumpt und dann aus einem Gasometer mit Wasserstoff gefüllt, welcher eine 5%ige alkalische Pyrogallollösung passierte, die ihn der letzten Spuren von Sauerstoff entledigte. Diese ganze Vorbehandlung wurde nach einer Stunde wiederholt; erst dann wurde der Versuch begonnen.

Darauf setzte ich durch den Trichter dem Blattpulver 10 ccm destilliertes Wasser zu, das ich folgendermaßen vorbehandelt hatte.

---

[1]) Dieser Versuch ist der Tabelle XIII entnommen.

Nachdem es in einem Kolben zum Sieden erhitzt und wieder erkaltet war, wurde Wasserstoffgas unter Druck hineingeleitet, das die gleiche Pyrogallollösung passiert hatte. Das Auskochen und Einleiten von Wasserstoffgas wurde zweimal durchgeführt. Die Wulffschen Flaschen kamen dann ins Wasserbad. Nach dem Versuch wurden die Enzyme durch 10 ccm ausgekochte Essigsäure abgetötet. Zur gleichen Zeit wurde ein gewöhnlicher Versuch mit einer Durchlüftung von 10 l pro Stunde als Kontrolle ausgeführt; Temperatur 38°.

Tabelle XII.

Versuch	Gas	C_2O_4'' im Material g	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4'' Abnahme g	Abnahme %
191	H_2	0,0102	0,1000	0,1074	0,0028	2,5
192	H_2	0,0102	0,1000	0,1065	0,0037	3,3
193	O_2	0,0102	0,1000	0,0708	0,0394	35,7

Der Versuch dauerte 3 Stunden.

In der Wasserstoffatmosphäre findet nur eine minimale Verarbeitung statt. Daß eine solche nicht völlig ausblieb, kann dadurch bedingt sein, daß nicht aller Sauerstoff entfernt werden konnte. Bei dem durchlüfteten Kontrollversuch erfolgte eine prompte Verarbeitung. Die enzymatische Verarbeitung des Oxalations ist also an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden. Das Enzym ist demnach eine Oxydase, die nach der Definition von Bach (1910) aus Oxygenase und Peroxydase besteht. Daß es sich um eine Oxydase handelt, geht auch daraus hervor, daß in allen Versuchen die Verarbeitung ohne Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd (Peroxyd) vonstatten geht.

c) Einfluß der Konzentration der Oxalationen auf ihre Verarbeitung.

Bei den nichtenzymatischen katalytischen Prozessen ist die Verarbeitung von der Konzentration des Substrats unabhängig, da die Verarbeitung durch das Massenwirkungsgesetz beherrscht ist. Bei enzymatischen Prozessen ist diese Unabhängigkeit von Konzentration und Verarbeitung nur dann vorhanden, wenn im Verhältnis zur Menge des Substrats[1]) die

[1]) Als Substrat wird im folgenden der Stoff bezeichnet, der vom Enzym verarbeitet wird.

Menge des Enzyms groß ist. Wächst aber die Menge des Substrats im Verhältnis zu derjenigen des Enzyms stark, so wird die Geschwindigkeit der Verarbeitung verringert.

Der Versuch über den Einfluß der Konzentration der Oxalationen auf ihre Verarbeitung wurde in der Art durchgeführt, daß zu je 1 g Rumexblattpulver verschiedene Konzentrationen des Oxalats zugesetzt wurden. Um die schädigende Wirkung der Abbauprodukte — in erster Linie Kohlendioxyd und Ammoniak — möglichst auszuschalten, wurde die Durchlüftung mit steigendem Oxalatgehalt gesteigert (vergl. S. 34). Der Versuch dauerte jeweilen 2 Stunden; Temperatur 37°.

Tabelle XIII.

C_2O_4'' in 50 ccm H_2O g	Konz. in 100 ccm H_2O g	C_2O_4'' gefunden nach d. Vers. g	C_2O_4'' Abnahme nach 2 Std. g	Abnahme %	Luftmenge per Kolben und Stunde
0,0100	0,02	0,0022	0,0078	78,0	200 ccm
0,0500	0,1	0,0319	0,0181	36,2	1 Liter
0,1000	0,2	0,0638	0,0362	36,2	2 „
0,5000	1,0	0,3727	0,1273	25,5	10 „
1,0000	2,0	0,7625	0,2375	23,7	20 „
2,500	5,0	0,2259	0,2741	10,9	50 „

Aus den Versuchen geht hervor, daß die Verarbeitung des Oxalats seiner Konzentration im allgemeinen nicht parallel geht. Wächst die Konzentration von 0,02 auf 0,1°/$_0$, so werden nicht 5 mal so viel Oxalationen verarbeitet, wie theoretisch zu erwarten wäre, sondern nur doppelt so viele. Bei Verdoppelung der Konzentration von 0,1 auf 0,2°/$_0$ wird jedoch auch die Verarbeitung verdoppelt. Werden die Oxalationen von der Konzentration 0,2 auf 1,0°/$_0$ vermehrt, so wächst die Verarbeitung nur um das 3,5- statt 5 fache.

Ferner berechtigen die Werte der prozentualen Verarbeitung zu dem Schluß, daß, je niedriger die Konzentration, um so größer der relative Umsatz ist und umgekehrt. Die Verarbeitung ist der Konzentration der Oxalationen nur dann annähernd proportional, wenn diese zur Enzymmenge in einem gewissen Verhältnis steht (vgl. Konzentration 0,1 und 0,2). Bei höheren Konzentrationen wächst die Verarbeitung nicht mehr proportional, sondern langsamer. Dies beeinflußt selbstverständlich die Geschwindigkeitskonstanten *K*; diese sind in folgender Tabelle zusammengestellt. Sie wurden berechnet nach der

Gleichung: $\log c_1 - \log c_2 = 0{,}4343 \cdot K \cdot t$ (vgl. Gleichung S. 32 in vereinfachter Form).

Konzentration:	0,02	0,1	0,2	1,0	2,0	2,5
$K = 10^3$	757	224	224	147	136	58
$K \cdot a$	15,14	22,4	44,8	147	272	145

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, daß mit wachsenden Konzentrationen die Werte der Geschwindigkeitskonstanten abfallen. Diese K-Werte sind also abhängig von der Anfangskonzentration. Je niedriger diese ist, um so größer der K-Wert; je höher die Konzentration steigt, um so mehr fallen die Geschwindigkeitskonstanten ab.

Das Produkt aus Anfangskonzentration a und der Geschwindigkeitskonstante K zeigt keine Konstanz, sondern steigt allmählich an, erreicht ein Maximum und fällt dann ab.

d) Einfluß der Enzymmenge auf die Oxalatverarbeitung.

Die folgenden Versuche sollen den Einfluß der Menge des Enzyms auf die Verarbeitung des Substrats klarstellen. Während bei den im letzten Abschnitt besprochenen Versuchen die Menge des Enzyms stets gleich groß war und die Menge des Oxalats verändert wurde, gab ich in den folgenden Versuchen dieselbe Menge Oxalat zu verschiedenen Mengen des Enzyms. Der Versuch dauerte 4 Stunden, Temperatur 38°.

Rumexblattpulver.

Tabelle XIV.

Angewandte Enzymmenge g	Konzentration d. Enzymmenge	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4''-Abnahme g	Abnahme %
0,05	1	0,1527	0,1408	0,0119	7,8
0,10	2	0,1527	0,1355	0,0172	11,2
0,50	10	0,1527	0,1131	0,0396	25,9
1,00	20	0,1527	0,0999	0,0528	34,5

Wir sehen aus dieser Versuchsserie, daß mit steigender Enzymmenge auch die Verarbeitung steigt. Es erhebt sich

nun die Frage, ob die Menge des verarbeiteten Oxalats der Menge des Enzyms proportional ist, ob also bei Verdoppelung der Enzymmenge auch die Verarbeitung verdoppelt wird. Dies ist jedoch nicht der Fall. Tabelle XIV zeigt, daß die Verarbeitung des Oxalats bedeutend langsamer ansteigt als die Zunahme der Enzymmenge. Eine solche Abweichung von der Proportionalität ist bei enzymatischen Prozessen schon öfters gefunden worden und wurde von Schütz (1885) folgendermaßen formuliert: „Der Umsatz (Verarbeitung) ist proportional der Quadratwurzel der Enzymmenge."

Diese Schützsche Regel wird durch die Gleichung $U = x\sqrt[2]{F}$ ausgedrückt, wobei U den Umsatz (Verarbeitung), F die Enzymmenge und x die Menge des Oxalats bedeutet, die durch die Konzentration 1 des Enzyms verarbeitet wird. Dies ist eine Konstante, die in diesem Beispiel den Wert von 0,0119 hat (vgl. Tabelle XV, S. 38).

In folgender Tabelle sind die gefundenen und die berechneten Werte zusammengestellt.

Tabelle XV.

Konzentration	Experimentell gef. Werte		Theoretische Werte		Gef. K-Werte, berechn. nach $\log c_1 - \log c_2 = 0{,}4343\, K \cdot t$	Theoret. Werte von K
	C_2O_4''-Abnahme	Abnahme %	C_2O_4''-Abnahme	Abnahme %		
1	0,0119	7,8	0,0119	7,8	0,0202	0,0202
2	0,0172	11,2	0,0168	11,0	0,0298	0,0285
10	0,0396	25,9	0,0376	24,6	0,0750	0,0638
20	0,0528	34,5	0,0532	34,9	0,1060	0,0903

Die berechneten und experimentell gefundenen Werte zeigen eine gute Übereinstimmung. Die Verarbeitung des Oxalations erfolgt also bei konstanter Menge der Oxalationen, aber variabler Enzymmenge unter den obwaltenden Versuchsbedingungen gemäß der Schützschen Regel. Des ferneren zeigt die Tabelle, daß mit zunehmender Enzymmenge auch die Geschwindigkeitskonstanten K wachsen, aber auch nicht proportional der Menge des Enzyms, sondern annähernd proportional der Quadratwurzel aus derselben. Dies verlangt auch die Schützsche Regel. Die gefundenen und theoretischen Werte weichen allerdings voneinander ab, was auch im folgenden zum Ausdruck kommt.

Relative Enzymmenge:	1	2	10	20
Geschw.-Konstanten $K = 10^4$	202	298	750	1060
$\frac{K}{\sqrt{F}}$	202	211	237	237

Der Quotient aus Geschwindigkeitskonstanten und Quadratwurzel aus der Enzymmenge sollte eine Konstante sein; tatsächlich nimmt er mit steigender Enzymmenge zu.

Helianthus-Enzympräparat.

Zu den Versuchen wurde das Enzympulver des Blattpreßsaftes von Helianthus annuus verwendet; Temperatur 38°. Versuchsdauer 4 Stunden.

Tabelle XVI.

Enzymmenge g	Relative Konzentration des Enzyms	C_2O_4'' zugesetzt g	C_2O_4'' gefunden g	C_2O_4''-Abnahme g	Abnahme %
0,01	1	0,1527	0,1500	0,0027	1,7
0,02	2	0,1527	0,1483	0,0044	2,8
0,10	10	0,1527	0,1426	0,0101	6,6
0,20	20	0,1527	0,1386	0,0141	9,2

Aus diesen Versuchen kann von neuem gefolgert werden, daß die Verarbeitung mit der Quadratwurzel aus der Enzymmenge wächst.

Die berechneten Werte sind in folgendem zusammengestellt.

Konzentration des Enzyms	Experimentell gefundene Werte		Theoretisch berechnete Werte		$\log c_1 - \log c_2 = 0{,}4343 \cdot K \cdot t$	
	C_2O_4''-Abnahme	Abnahme %	C_2O_4''-Abnahme	Abnahme %	K gefunden	K berechnet
1	0,0027	1,7	0,0027	1,7	0,00440	0,0044
2	0,0044	2,8	0,0038	2,4	0,00709	0,0062
10	0,0101	6,6	0,0085	5,4	0,01710	0,0139
20	0,0141	9,2	0,0121	7,6	0,02420	0,0197

Die gefundenen Werte weichen von den berechneten stärker ab als bei dem Versuch mit Rumexblattpulver; dies kann da-

durch bedingt sein, daß die erste gefundene Zahl 0,0027, auf der sich die weiteren Berechnungen aufbauen, etwas zu klein ist.

Die Ursache der Abweichung von der Proportionalität bei einer Steigerung der Enzymkonzentration kann einerseits durch die Abbauprodukte, andererseits durch die Änderung der Konzentration der Wasserstoffionen bedingt sein.

e) Der Verlauf der Oxalatverarbeitung.

Die Verarbeitung der Oxalationen muß auch als enzymatischer Vorgang den Gesetzen der Kinetik unterworfen sein. Wie verhalten sich nun diesen gegenüber die Blattpulver des säurehaltigen Rumex und des säurefreien Helianthus?

Das die chemischen Umsetzungen beherrschende, für Physiologie und Chemie gleich wichtige Gesetz der chemischen Massenwirkung von Guldberg und Waage besagt, daß die Geschwindigkeit jeder Reaktion der Konzentration der reagierenden Stoffe proportional ist. Diese Gesetzmäßigkeit kann durch dieselbe Gleichung: $K = \frac{1}{t} \cdot \log \text{nat} \cdot \frac{a}{a - x}$ ausgedrückt werden, welche auch für die monomolekulare Reaktion gilt. In dieser Gleichung bedeutet K die Geschwindigkeitskonstante, a die Anfangskonzentration und x die während des Zeitintervalles t verarbeitete Oxalatmenge.

Die Hydrolyse des Rohrzuckers durch eine Säure ist z. B. eine solche monomolekulare Reaktion, bei der die Gültigkeit dieses Gesetzes zahlenmäßig nachgewiesen werden konnte[1]).

Die Versuche mit Rumex und Helianthus führte ich in folgender Weise durch.

In einen 1 l fassenden Kolben mit Helmaufsatz wurden 400 ccm einer ca. $^1/_2$ $^0/_0$igen Ammoniumoxalatlösung und 16 g Blattpulver gebracht. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden mittels einer Pipette aus dem Versuchskolben 50 ccm der Lösung, somit der Blattpulvermenge wie auch der Oxalatlösung, ein aliquoter Teil entnommen und der Analyse unterworfen, um das noch unverarbeitete Oxalat zu bestimmen.

---

[1]) Euler, 1908, S. 41.

Versuche mit Rumex-Blattpulver.

Aus der Tabelle XVII wie auch aus Fig. 2 läßt sich ersehen, daß die Verarbeitung von der 0. bis zur 90. Minute stetig ansteigt. Nach der 90. Minute geht die Verarbeitung nur noch allmählich vorwärts; die Kurve verläuft darum fast parallel der Abszissenachse. Ich habe in Fig. 2 auch die theoretische Kurve eingetragen. Diese würde man erhalten, wenn die Reaktion einzig und allein dem Massenwirkungsgesetze folgte und wenn keine störenden Nebeneinflüsse wirksam wären. Die tatsächlich erhaltene Kurve liegt unter der theoretischen; die beiden decken sich also nicht. Von letzterer weicht die tatsächlich erhaltene Kurve besonders stark zwischen der 90. und 150. Minute ab. Die Geschwindigkeitskonstanten, die nach der Gleichung für die monomolekularen Reaktionen berechnet wurden, zeigen mit Ausnahme des ersten und letzten Wertes eine gute Konstanz. Der erste Wert liegt vielleicht darum zu hoch, weil während der Zeit des Einbringens des Blattpulvers, des Umschüttelns und der Probeentnahme schon eine minimale Verarbeitung stattgefunden haben kann. Der letzte K-Wert fällt offenbar infolge einer Verlangsamung der Verarbeitung stark ab. Diese kann zunächst durch die Abbauprodukte (Kohlendioxyd, Ammoniak usw.) bedingt sein, die trotz gleichmäßiger Durchlüftung vielleicht nicht in genügendem Maße fortgeführt wurden. Dann kann aber auch die Verarbeitung durch die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration verzögert worden sein. Diese wurde bei jeder Probeentnahme mit Lakmuspapier geprüft. Dabei konnte in der zuerst sauren Lösung nach der 5. Probe nur noch eine schwach saure Reaktion festgestellt werden; in der 6. Probe trat schon eine schwach alkalische Reaktion auf, die bis zur 7. und letzten Entnahme sich noch merklich verstärkte. Diese kann wohl die Ursache der gegen Ende des Versuches deutlichen Verminderung der Oxalatverarbeitung sein. Schon Bassalik (1917) hat gezeigt, daß die Verarbeitung des Oxalations bei Rumex im alkalischen Medium sehr träge verläuft. Die Verarbeitung des Oxalations durch das Enzym von Rumex erfolgt während der ersten Zeitintervalle nach der monomolekularen Gleichung, später weicht sie stark von ihr ab.

Tabelle XVII.

Versuch	Temperatur °C	Blattmenge g	Zeiten	Luft pro Zeitintervall l	C_2O_4'' in 50 ccm Probeentnahme	C_2O_4'' gef. nach Zeitintervall in 50 ccm g	Abnahme %	Reaktion der Probe	$\log \frac{a}{a-x}$	K	K''	Theoretische Abnahme %
						Rumex.						
1	30	1,06	sofort	—	0,1707	—	—	sauer	—	—	—	—
2	30	1,08	15′	1,2	—	0,1548	9,3	„	0,09777	0,00651	—	10,0
3	30	1,03	30′	1,5	—	0,1460	14,5	„	0,15629	0,00521	—	19,0
4	31	0,97	45′	1,5	—	0,1338	21,6	„	0,24356	0,00541	—	27,0
5	30,5	1,00	60′	1,8	—	0,1258	26,3	schw. sauer	0,30521	0,00509	—	35,9
6	30	0,82	90′	3,7	—	0,1047	38,7	schw. alkal.	0,48881	0,00543	—	48,1
7	30,5	1,04	150′	7,6	—	0,0990	42,0	alkalisch	0,54478	0,00363	—	66,0
						Helianthus.						
1	31	—	sofort	—	0,1404	—	—	sauer	—	—	—	—
2	31	—	15′	2,5	—	0,0871	37,9	„	0,47744	0,0318	0,0266	38,0
3	31	—	30′	2,5	—	0,0558	60,2	„	0,92275	0,0307	0,0235	61,5
4	30½	—	45′	2¾	—	[0,0309[1])]	(78,0)	„	(1,51378)	(0,0336)	(0,0236)	76,1
5	30	—	60′	3	—	0,0081	94,2	schw. sauer	2,85328	0,0475	0,0293	85,2
6	31	—	90′	5,5	—	0,0000	100,0	alkalisch	—	—	—	90,2

Fig. 2.

Fig. 3.

[1]) Diese Analyse mißlang. Die Werte sind durch Interpolation berechnet.

Versuche mit Helianthus-Blattpulver.

Die Versuche wurden mit Helianthus tuberosus durchgeführt. Da die Analyse der Probe, die nach der 45. Minute entnommen wurde, mißlang, wurden die in der Tabelle XVII angeführten Werte durch Interpolation berechnet. Den übrigen Zahlen der Tabelle ist zu entnehmen, daß die Verarbeitung rascher verläuft als bei Rumex; denn nach der 6. Probe konnte kein Oxalat mehr gefunden werden. Vergleichen wir an Hand der Fig. 3 den tatsächlichen Verlauf des Prozesses mit der theoretischen Kurve, so finden wir zu Beginn eine gute Übereinstimmung, während später die gefundenen Werte über die theoretisch berechneten ansteigen. Die Verarbeitung erfolgt also bedeutend rascher als nach der logarithmischen Kurve.

Die nach der monomolekularen Gleichung berechneten Werte der Geschwindigkeitskonstanten bleiben nicht konstant, sondern steigen mit zunehmender Versuchsdauer an. Auch hier muß der für die erste Entnahme gefundene Wert der Konstanten als zu hoch angesehen werden, aus Gründen, die ich auf S. 41 angegeben habe. Da die nach der monomolekularen Gleichung berechneten Werte der Geschwindigkeitskonstanten ansteigen, also nicht konstant sind, ergibt sich der Schluß, daß die Verarbeitung des Oxalations bei Helianthus der monomolekularen Gleichung nicht folgt.

Solche Abweichungen von der Gleichung hat auch Henri (1903) bei seinen Untersuchungen über die Hydrolyse des Rohrzuckers mittels Invertase gefunden; er nimmt an, daß während der Reaktion Stoffe entstehen, die den Prozeß autokatalytisch beschleunigen.

Für solche autokatalytische Umsetzungen stellt Henri (1901) folgende Gleichung auf:

$$K'' = \frac{1}{2t} \log \text{nat} \frac{a + x}{a - x}.$$

In dieser Gleichung bedeutet K'' eine Konstante, t das Zeitintervall, a die Anfangskonzentration und x die während der Zeit t verarbeitete Oxalatmenge. Aus der letzten Kolonne der Tabelle XVII ergibt sich, daß die K''-Werte im Gegensatz zu den K-Werten konstant sind. Die Verarbeitung des Oxalations verläuft somit bei Helianthus nach der Gleichung der

Autokatalyse. Dies nötigt zu der Annahme, daß die während des Prozesses entstehenden Abbauprodukte einen im Blattpulver enthaltenen Stoff aktivieren, der seinerseits die enzymatische Tätigkeit beschleunigt. Auf diesen katalytischen Vorgang ist auch die raschere Verarbeitung des Oxalations bei Helianthus als bei Rumex zurückzuführen.

f) Produkte der Verarbeitung.

Auf S. 33 wurde gezeigt, daß der enzymatische Abbau des Oxalations durch eine Oxydase bewirkt wird. Es soll nun noch an zwei Beispielen nachgewiesen werden, daß dabei Kohlendioxyd entsteht. Die Versuchsanordnung war die übliche, nur wurde zwischen Versuchskolben und Aspirator eine Pettenkofersche Röhre eingeschaltet, die mit titrierter Barytlauge beschickt war. Nach dem Versuch wurde die noch unzersetzte Oxalatmenge bestimmt und die nichtgebundene Lauge gegen $^n/_{10}$-Salzsäure zurücktitriert; als Indicator wurde Phenolphtalein benutzt.

Zur gleichen Zeit wurde ein Kontrollversuch mit einer abgewogenen Menge des Präparates in Wasser ohne Zusatz von Oxalat ausgeführt.

Tabelle XVIII.

Versuchs-Nr.	Pflanze	Enzym g	Temperatur °C	C_2O_4''-Abnahme in 24 Std. g	$^n/_{10}$-$Ba(OH)_2$ i. d. Pettenkoferschen Röhre ccm	$^n/_{10}$-HCl-Verbrauch ccm	CO_2 mg
5	Ungekeimtes Pisum sativum	5,0	35	0,0300	225,4	150,0	165,9
4	Ungekeimtes Pisum sativum in Wasser	5,0	35	—	244,0	178,0	145,2
140	Helianthus Enzympulver	0,3593	37	0,0744	104,8	86,8	39,6
141	Helianthus Enzympulver in Wasser	0,3500	37	—	107,2	101,7	11,1

Bei der Verarbeitung des Oxalations entsteht somit Kohlendioxyd. Jedoch kann zwischen der Oxalatabnahme und dem ausgeschiedenen Kohlendioxyd keine Relation festgestellt werden.

Auffallenderweise entsteht nun bei Pisum sativum mehr Kohlendioxyd als der abgebauten Oxalatmenge entspricht. Dieser Kohlendioxydüberschuß rührt offenbar von anderen im Samen erfolgenden enzymatischen Prozessen her. Daß beim Versuch mit Enzympulver von Helianthus weniger Kohlendioxyd ausgeschieden wurde als dem verarbeiteten Oxalat entspricht, zeigt, daß, wie schon Bassalik fand, neben Kohlendioxyd noch andere Abbauprodukte entstehen; nach diesen wurde aber nicht gesucht. Während Zaleski und Reinhard (1911) den enzymatischen Prozeß der Oxalatverarbeitung beim Weizenmehl nur auf Grund des ausgeschiedenen Kohlendioxyds festzustellen versucht haben, zeigen meine Versuche, daß man aus der Menge dieses Abbauproduktes allein kein richtiges Bild von der Menge des verarbeiteten Oxalations erhält. Nur eine quantitative Bestimmung der Abnahme des Oxalations selbst ermöglicht einen Einblick in die tatsächlichen Verhältnisse.

Da beim Abbau der Oxalsäure Kohlendioxyd gebildet wird, liegt die Vermutung nahe, daß das oxalatverarbeitende Enzym eine Carboxylase sei. Eine solche findet sich nicht nur in der Hefe (Neuberg [1911]), sondern, wie Zaleski (1913) festgestellt hat, auch in Samenpflanzen, wo sie aus brenztraubensauren Salzen Kohlendioxyd abspaltet und den Rest des Moleküls in Acetaldehyd überführt.

III. Schlußbetrachtung.

Bisher war ein oxalatverarbeitendes Enzym erst bei säurehaltigen Rumex-, Oxalis- und Begoniaarten nachgewiesen worden. Meine Arbeit verfolgt den Zweck, festzustellen, ob ein solches Enzym im Pflanzenreich — abgesehen von den Succulenten — allgemein verbreitet und auch bei säurefreien Pflanzen vorhanden sei. Dabei zeigte sich, daß alle von mir untersuchten Pflanzen und Pflanzenteile, sowohl die chlorophyllhaltigen wie auch die chlorophyllosen Gewebe und Zellen, die von außen zugesetzten gelösten Oxalationen mittels eines enzymatischen Prozesses verarbeiten können. Diese allgemeine Verbreitung des oxalatverarbeitenden Enzyms ist für den Stoffwechsel des Pflanzenorganismus von großer Bedeutung.

Mögen nun im Pflanzenkörper die Oxalationen dem aufbauenden oder assimilatorischen Stoffwechsel ihre Entstehung verdanken[1]), oder als Produkte unvollständiger Verbrennung der Kohlenhydrate[2]), oder endlich als Nebenprodukte der Eiweißsynthese anzusehen sein[3]), so werden sie mit Hilfe des Enzyms stets wieder in den Stoffwechsel einbezogen. Aus der Verarbeitung des Oxalations erhält die Pflanze nutzbare Energie, vielleicht auch höhere Kohlenstoffverbindungen.

Die Ansicht von de Vries (S. 59), nach der die Bildung und das Verschwinden organischer Säuren ein kontinuierlich fortschreitender Prozeß ist, erhält dadurch eine Stütze. Es ist auffallend, daß das aus dem säurefreien Helianthus hergestellte Enzym das Oxalation viel rascher und vollständiger verarbeitet als das aus dem säurehaltigen Rumex gewonnene. Dies legt die Vermutung nahe, daß Oxalate auch in den säurefreien Pflanzen in reichlicher Menge gebildet, jedoch durch das Enzym alsbald wieder abgebaut werden.

Zusammenfassung.

1. Die Oxalationen werden in allen untersuchten Pflanzenorganen enzymatisch verarbeitet.

2. Nicht nur in den chlorophyllhaltigen Blättern, sondern auch in den Stengeln, Wurzeln, chlorophyllfreien Samen und etiolierten Organen konnte dieses Enzym festgestellt werden.

3. Ein aus den Helianthusblättern dargestellter Preßsaft, wie auch ein durch Alkohol gefälltes Pulver vermögen die zugesetzten Oxalationen zu verarbeiten.

4. Das Enzym wird in Wasser durch Siedehitze zerstört.

5. Das Temperaturoptimum der Verarbeitung liegt zwischen 30 und 40°.

6. Die Verarbeitung ist in hohem Maße von der Sauerstoffzufuhr abhängig; in einer Wasserstoffatmosphäre findet keine Verarbeitung statt.

7. Mit steigender Oxalatkonzentration wird der relative Umsatz kleiner.

---

[1]) Baur (1913), Steinmann (1917), Bassalik (1917).

[2]) Kraus (1886b), Mayer (1875), Pfeffer (1897), Warburg (1886), Wehmer (1891), Czapek (1917).

[3]) Palladin (1887), Schimper (1890), Meyer (1918).

8. Bei wachsender Enzymkonzentration steigt die Verarbeitung mit der Quadratwurzel der Enzymmenge (Schützsche Regel).

9. Die Verarbeitung erfolgt beim Rumexblattpulver nach der monomolekularen Gleichung, während beim Helianthusblattpulver die Verarbeitung dem Gesetz der Autokatalyse unterworfen ist.

10. Das Enzym ist eine Oxydase.

11. Die Oxalationen werden durch diese Oxydase nur teilweise zu Kohlendioxyd abgebaut (bei Pisum zweifelhaft); andere Abbauprodukte sind bis jetzt noch unbekannt. Es scheint, daß das Enzym carboxylaseartiger Natur sei.

Literaturverzeichnis.

Amar, M., Sur le rôle de l'oxalate de calcium dans la nutrition des végétaux, Compt. rend. **136**, I, II, 901, 1903.

Bach, A., Die langsame Verbrennung und die Oxydationsfermente. Fortschritte der Naturwissenschaft **1**, 85, 1910.

Bassalik, K., Über die Verarbeitung der Oxalsäure des Bacillus extorquens, Jahrb. f. wissensch. Bot. **53**, 235, 1913.

Derselbe, Über die Rolle der Oxalsäure bei den grünen Pflanzen. I. Die Zersetzung der Oxalsäure bei Rumex acetosa. Bulletin de l'Acad. des sciences de Cracovie S. B. **1917**, S. 203.

Baur, E., Die Genesis der Kohlenhydrate. Die Naturwissenschaften **1**, 474, 1913.

Bayliss, Die Wirkung der Fermente **1910**.

Benecke, W., Über Oxalsäurebildung in grünen Pflanzen. Bot. Ztg. **61**, 79, 1903.

Brown and Morris, A., Contribution to the chemistry and physiology of foliage leaves. Journ. of the chem. Soc. **1**, 604, 1893.

Buchner, Die Zymasegärung **1903**.

Czapek, F., Biochemie der Pflanzen **2**, 1905.

Derselbe, Die Kultur der Gegenwart: Physiologie und Ökologie **3**, 1917.

Euler, H., Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie **1908**, II. und III. Teil.

Gerber, C., Recherches sur la maturation des fruits charnus. Annales d. sciences nat., 8e série, Bot. **4**, 1, 1896.

Henri, V., Über das Gesetz der Wirkung des Invertins, Zeitschr. f. physikal. Chem. **39**, 194, 1901.

Derselbe, Lois générales de l'action des Diastases. Thèse, Paris **1903**, 1.

Höber, R., Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. **1914**, 4. Aufl.

Kanitz, A., Die Biochemie in Einzeldarstellungen; Temperatur und Lebensvorgänge. **1915**.

Kraus, G., Über die Wasserleitung in der Pflanze, IV. Die Acidität des Zellsaftes. Abhandl. d. Naturf. Gesellsch. zu Halle **16**, 143, 1886a.

Derselbe, Über den Stoffwechsel der Crassulaceen. ibidem, **16**, 395, 1886b.

Lange, P., Beiträge zur Kenntnis der Zellsaftacidität, Inaug.-Diss. Halle 1886.

Mayer, A., Über die Bedeutung der organischen Säuren in den Pflanzen. Landw. Vers.-Stat. **18**, 410, 1875.

Derselbe, Über die Sauerstoffausscheidung einiger Crassulaceen. Landw. Vers.-Stat. **31**, 277, 1878.

Meyer, Arth., Die Beziehung zwischen Eiweiß- und Säurebildung in Laubblättern. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **36**, 508, 1918.

Neuberg, C. u. L. Karczag. Carboxylase, ein neues Enzym der Hefe. Diese Zeitschr. **36**, 68, 1911.

Oppenheimer, C., Die Fermente und ihre Wirkungen, 3. Aufl. 1910.

Palladin, W., Die Bildung organischer Säuren in wachsenden Pflanzenteilen. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **5**, 325, 1887.

Derselbe, Eiweißgehalt der grünen nnd etiolierten Blätter. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **9**, 194, 1891.

Derselbe, Aschengehalt etiolierter Blätter. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **10**, 179, 1892.

Derselbe, Recherches sur la corrélation entre la respiration des plantes et les substances azotées actives. Revue gén. d. botanique **8**, 225, 1896.

Derselbe, Die Arbeit der Atmungsenzyme unter verschiedenen Verhältnissen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**, 407, 1906.

Derselbe, Pflanzenphysiologie **1911**.

Pfeffer, W., Pflanzenphysiologie **1**, 2. Aufl., 1897.

Rosenthaler, Eiweiß als Schutzmittel der Enzyme. Diese Zeitschr. **26**, 9, 1910.

Schimper, A. F. W., Zur Frage der Assimilation der Nährstoffe durch die grüne Pflanze. Flora **73**, 207, 1890.

Schütz, E., Eine Methode zur Bestimmung der relativen Fermentmengen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**, 577, 1885.

Slator, A., Studies in fermentation. The chemical dynamics of alcoholic fermentation by yeast. Journ. of chem. Soc. **89**, 136, 1906.

Spoehr, H., Photochemische Vorgänge bei der diurnalen Entsäuerung der Succulenten. Diese Zeitschr. **57**, 99, 1913.

Steinmann, Alf., Studien über die Acidität des Zellsaftes beim Rhabarber. Zeitschr. f. Bot. **9**, 1, 1917.

Stoklasa, Beitrag zur Ernährung der Zuckerrübe. Phys. Bedeutung des Kaliumions im Organismus der Zuckerrübe **1916**.

Tammann, G., Zur Wirkung ungeformter Fermente. Zeitschr. f. physikal. Chem. **18**, 436, 1895.

de Vries, Über die Periodizität im Säuregehalt der Fettpflanzen. Verslagen en Mededeelingen der K. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam III. reeks I. deel, S. 58, 1885.

Warburg, O., Über die Bedeutung der organischen Säuren im Lebensprozeß der Pflanzen. Unters. a. d. Bot. Inst. Tübingen **2**, 53, 1886.

Wehmer, C., Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. Bot. Zeitung **49**, 233, 1891.

Zaleski, W., Über die Verbreitung der Carboxylasen in Pflanzen. Ber. d. Deutsch. Botan. Ges. **31**, 349, 1913.

Zaleski und Reinhard, Über die fermentative Oxydation der Oxalsäure. Diese Zeitschr. **33**, 449, 1911.

Die Wirkung des Hypophysenextraktes, insbesondere eines aus dem Hypophysenhinterlappen isolierten Polypeptides, auf die Harnabsonderung.

Von

Erich Leschke.

(Aus der II. medizinischen Universitätsklinik in Berlin.)

(Eingegangen am 5. Mai 1919.)

Mit 6 Figuren im Text.

Im folgenden soll über das Ergebnis von Untersuchungen berichtet werden, die zu dem Zwecke unternommen worden sind, die Wirkung des Extraktes aus den verschiedenen Teilen der Hypophyse (pars anterior s. glandularis, pars intermedia, pars posterior s. nervosa s. infundibularis) sowie einiger aus dem Hinterlappen isolierter krystallisierter Polypeptide auf die Harnabsonderung festzustellen.

Die Versuche sind zunächst an Fällen von Diabetes insipidus ausgeführt worden, weil diese eine stets gleichmäßige, auf ein nahezu konstantes niederes spezifisches Gewicht fixierte Diurese aufweisen, deren Änderung darum besonders augenfällig und beweisend ist, sodann an Fällen anderweitig bedingter Polyurie und endlich an Gesunden.

Die bisherigen Angaben über die Wirkung des Hypophysenextraktes auf die Diurese lauten widersprechend.

Während Oliver Schaefer und Herring sowie Hoskins eine Steigerung der Diurese nach Injektion von Hypophysenhinterlappenextrakt beobachteten, fanden van de Velden, C. Römer, Garnier und Schulmann, Bab, Eisner[1]) u. a. eine Verringerung der Diurese

---

[1]) Literatur siehe bei Leschke, Beitr. z. klin. Pathol. d. Zwischenhirns, I. Mitteilung. Experim. u. klin. Untersuchung über Diabetes insipidus, seine Beziehung zur Hypophyse und zum Zwischenhirn. Zeitschr. f. klin. Med. 87, 1919, sowie C. u. M. Oehme, Zur Lehre vom Diabetes insipidus. Arch. f. klin. Med. 127, 1918.

und Zunahme der Konzentration bei Versuchen an Tieren und Menschen. Der Widerspruch scheint sich mir dadurch aufzuklären, daß die zeitlichen Bedingungen bei den Versuchen der erst- und letztgenannten Autoren verschiedene waren. In den ersten Minuten nach einer Hypophyseninjektion tritt in der Tat die von Schaefer und Herring beobachtete Steigerung der Diurese ein, wovon ich mich bei Versuchen an Kaninchen mit Blasenfistel überzeugen konnte. Diese Steigerung hält jedoch nur 10 bis 20 Minuten vor, um dann einer Verminderung Platz zu machen, die ihrerseits bis zu mehreren Stunden anhalten kann und im Endeffekt die geringe anfängliche Steigerung jedenfalls weit überwiegt. Das gleiche Verhalten hatten früher auch v. Konschegg und Schuster, sowie C. und M. Oehme in beweisenden Tierversuchen festgestellt. Beim Versuch am Menschen, wo nur die $^1/_2$- bis 1stündlichen Harnportionen untersucht werden, tritt nur die Hemmung der Diurese, Wasserausscheidung und Erhöhung der Harnkonzentration in Erscheinung.

Diese Steigerung des Konzentrationsvermögens der Niere durch Injektion von Hypophysenhinterlappenextrakt tritt nun nicht nur beim Gesunden, sondern bemerkenswerterweise auch beim Wasserharnruhrkranken auf. Solche Beobachtungen sind von van de Velden, Farini, C. Römer, Paguiez und Bergé, Lereboulef und Faure-Beaulieu, v. Konschegg und Schuster, Graul, Hoppe-Seyler, H. Strauß, Bab, Eisner, Krämer, Schiff, Matzfeld und Kleeblatt mitgeteilt worden, während Steiger nach Injektion von Pituglandol keine solche Steigerung fand. Die Divergenzen in den Resultaten der verschiedenen Untersucher beruhen darauf, daß meist nur die Tagesmenge des ausgeschiedenen Harns berücksichtigt worden ist. C. und M. Oehme haben das Verdienst, nachgewiesen zu haben, daß der Angriffspunkt des Hypophysenextraktes in der Niere liegt.

In den von mir untersuchten Fällen habe ich versucht:

1. die Kurve der Hypophysenextraktwirkung durch $^1/_2$- bis 1stündliche Bestimmung der Harnausscheidung festzustellen,
2. das Verhältnis zwischen der Menge des Hypophysenextraktes und der Dauer und Intensität der harnkonzentrierten Wirkung zu bestimmen,
3. die Wirkung verschiedener Extrakte aus verschiedenen Hypophysenteilen zu vergleichen und
4. diejenige Substanz zu isolieren, die die Harnkonzentration verursacht.

a) Versuche mit Hypophysenhinterlappenextrakt.

1. Wirkung auf die Diurese bei Diabetes insipidus.

Zu den Versuchen wurden folgende Extrakte aus dem Hinterlappen von Rinderhypophysen benutzt:

Tabelle I.

Harnkonzentrierende Wirkung von 1 ccm Pituglandol intramuskulär (10h) bei Diabetes insipidus. Fall 1.

Stunde 15. II. 16	Menge	Spez. Gew.	Kochsalz %	Kochsalz g	Harnstoff %	Harnstoff g	Phosphate %	Phosphate g
8–10	300	1003	0,078	0,834	0,125	0,375	0,012	0,036
10–11½	350	1005	0,098	0,343	0,175	0,613	0,014	0,049
11½–12	120	**1010**	0,420	0,504	0,513	0,616	**0,059**	0,071
12–12½	125	1006	0,375	0,446	0,475	0,594	0,018	0,023
12½–1	40	**1010**	**0,425**	0,170	**0,525**	0,210	**0,056**	0,022
1–1½	134	**1010**	**0,405**	0,543	**0,510**	0,683	**0,045**	0,060
1½–2	194	1009	0,342	0,663	0,425	0,825	0,020	0,039
2–2½	230	1005	0,095	0,219	0,156	0,359	0,014	0,032
2½–3	310	1005	[1] 0,095	0,295	0,156	0,484	0,014	0,043
3–3½	240	1005	0,095	0,228	0,156	0,374	0,014	0,034
3½–5	410	1002	0,078	0,320	0,125	0,513	0,013	0,053
5–7	850	1002	[1] 0,078	0,663	0,125	1,063	0,013	0,111
7–9	1000	1002	0,078	0,780	0,125	1,250	0,013	0,130
Nacht 9–8	4640	1001	0,052	2,413	0,085	3,944	0,006	0,278
Summe	8943	1005	0,087	7,821	0,133	11,903	0,011	0,981

Tabelle II.

Harnkonzentrierende Wirkung von 10 ccm Pituglandol intramuskulär (10h). Fall 1.

Stunde 17. II. 16	Menge	Spez. Gew.	Kochsalz %	Kochsalz g	Harnstoff %	Harnstoff g	Phosphate %	Phosphate g
8–10	570	1004	0,065	0,371	0,105	0,599	0,009	0,051
10–11	320	1004	0,065	0,208	0,105	0,336	0,009	0,029
11–11½	**66**	**1008**	0,082	0,054	0,154	0,102	0,012	0,008
11½–12	**88**	**1011**	**0,425**	0,374	0,415	0,365	0,052	0,046
12–12½	**50**	**1011**	**0,425**	0,213	0,415	0,208	0,052	0,026
12½–1	**47**	**1014**	**0,880**	0,414	**0,938**	0,441	**0,130**	0,061
1–1½	**31**	**1014**	**0,883**	0,274	**0,933**	0,289	**0,130**	0,040
1½–2	**51**	**1012**	**0,425**	0,217	**0,615**	0,314	0,055	0,028
2–2½	118	**1011**	**0,425**	0,502	**0,615**	0,726	0,055	0,065
2½–3	160	**1012**	**0,425**	0,680	**0,615**	0,984	0,055	0,088
3–5	250	**1010**	0,220	0,550	0,402	1,005	0,034	0,085
5–7	220	**1010**	0,220	0,484	0,402	0,884	0,034	0,075
7–9	240	1009	0,110	0,264	0,230	0,552	0,034	0,082
Nacht 9–11	300	1003	0,072	0,216	0,125	0,375	0,011	0,033
11–1	750	1003	0,072	0,540	0,125	0,938	0,011	0,083
1–4	520	1006	0,072	0,374	0,125	0,650	0,011	0,057
4–6½	600	1003	0,072	0,432	0,125	0,750	0,011	0,066
6½–8	850	1003	0,072	0,612	0,125	1,063	0,011	0,094
Summe	5231	1009	0,130	6,779	0,202	10,581	0,019	1,017

[1]) Die eingeklammerten Zahlen sind Bestimmungen des Durchschnitts der 1- bis 2stündlichen Harnmengen.

1. Pituglandol (Hoffmann-La Roche),
2. Coluitrin (Freund & Redlich).

Nachdem bei den am Diabetes insipidus leidenden Kranken in einer Vorperiode die normale Tageskurve der Harnabsonderung sowie das Konzentrationsvermögen und die Salzausscheidung geprüft worden waren, wurde ihnen morgens Hypophysenextrakt subcutan, intramuskulär oder intravenös injiziert und die Harnabsonderung am Versuchstage in $^1/_2$- bis 1 stündlichen Zwischenräumen untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tabellen I bis IV dargestellt.

Tabelle III.

Harnkonzentrierende Wirkung von 10 ccm Colaitrin intravenös (9^h.) Fall 1.

Stunde 10. IV. 16	Menge	Spez. Gewicht	Kochsalz		Harnstoff	
			%	g	%	g
8–9	210	1002	0,074	0,155	0,130	0,273
9–10	170	1003	0,074	0,126	0,130	0,221
10–10$^1/_2$	146	1006	0,123	0,180	0,266	0,388
10$^1/_2$–11	**66**	**1014**	**0,665**	0,439	**0,700**	0,462
11–11$^1/_2$	**64**	**1014**	**0,722**	0,462	**0,752**	0,481
11$^1/_2$–12	—	—	—	—	—	—
12–1	**36**	**1015**	**0,850**	0,306	**0,888**	0,320
1–2	130	**1014**	**0,795**	1,034	**0,706**	0,918
2–3	**86**	**1013**	**0,790**	0,679	**0,706**	0,607
3–5	300	**1011**	0,421	1,263	**0,658**	1,974
5–7	360	1008	0,350	1,260	0,426	1,534
7–9	510	1005	0,095	0,485	0,175	0,893
Nacht 9–8	4650	1003	0,065	3,023	0,112	5,208
Summe	6728	1010	0,140	9,412	0,196	13,279

Einen besonders reinen, in krystallisierter Form gewonnenen Hypophysenextrakt stellt das Hypophysin (Höchster Farbwerke) dar. Es wird durch Extraktion des Hypophysenhinterlappens mit Wasser, Enteiweißung mit Phosphorwolframsäure, Zerlegung des eiweißfreien Filtrats mit Barytlauge und Fällung des Baryts im Filtrat mit Schwefelsäure erhalten. Das durch Einengen im Vakuum krystallisiert gewonnene schwefelsaure Salz, das als Hypophysin bezeichnet wird, hat die gleichen Wirkungen wie der ursprüngliche Hypophysenextrakt, wie die folgenden Versuche zeigen. (Tabellen IV bis VI und Kurve 1 bis 2.)

Tabelle IV.

Harnkonzentrierende Wirkung von 1 ccm **Hypophysin intramuskulär** (11^{h}) bei Diabetes insipidus. Fall 1.

Stunde 16. II. 16	Menge	Spez. Gew.	Kochsalz %	Kochsalz g	Harnstoff %	Harnstoff g	Phosphate %	Phosphate g
8–11	820	1002	0,075	0,618	0,120	0,984	0,009	0,074
11–11½	166	1006	[1] 0,103	0,171	0,205	0,340	0,112	0,186
11½–12	116	1007	0,103	0,119	0,205	0,238	0,012	0,014
12–12½	**70**	**1010**	**0,525**	0,368	**1,020**	0,714	**0,038**	0,027
12½–1	207	1006	[1] 0,082	0,170	0,145	0,300	0,008	0,017
1–1½	104	1006	0,082	0,085	0,145	0,151	0,008	0,008
1½–2	215	1004	[1] 0,080	0,172	0,140	0,301	0,008	0,017
2–2½	202	1003	0,080	0,166	0,140	0,290	0,008	0,017
2½–3	345	1002	0,062	0,214	0,112	0,386	0,006	0,021
3–3½	400	1002	0,062	0,248	0,112	0,448	0,006	0,024
3½–5	310	1001	0,062	0,192	0,112	0,347	0,006	0,019
5–7	360	1001	0,062	0,223	0,112	0,403	0,006	0,022
7–9	1030	1002	0,062	0,639	0,112	1,154	0,006	0,062
Nacht 9–8	4710	1004	0,060	2,826	0,103	4,946	0,007	0,330
Summe	9060	1004	0,068	6,208	0,121	11,002	0,009	0,838

Tabelle V.

Harnkonzentrierende Wirkung von 3 ccm **Hypophysin intravenös** (10^{h}) bei Diabetes insipidus. Fall 1.

Stunde 12. II. 16	Menge	Spez. Gew.	Kochsalz %	Kochsalz g	Stickstoff %	Stickstoff g	Phosphate %	Phosphate g
8–10	510	1001	0,102	0,520	0,075	0,383	0,006	0,031
10–11	290	1002	0,139	0,403	0,070	0,203	0,006	0,017
11–12	**150**	**1010**	0,242	0,363	0,225	0,337	0,015	0,023
12–12½	**63**	**1012**	**0,461**	0,290	**0,525**	0,331	**0,060**	0,038
12½–1	**37**	**1015**	**1,152**	0,426	**0,812**	0,300	0,033	0,012
1–1½	**80**	**1012**	**0,439**	0,351	**0,505**	0,404	0,030	0,024
1½–2	130	1010	0,201	0,261	0,210	0,273	0,010	0,013
2–2½	120	1009	0,150	0,180	0,105	0,126	0,008	0,010
2½–3	160	1008	0,111	0,178	0,112	0,179	0,008	0,013
3–4	230	1007	0,100	0,230	0,108	0,248	0,006	0,014
4–6	1000	1006	0,078	0,780	0,112	1,120	0,008	0,080
6–8	400	1002	0,062	0,248	0,095	0,380	0,008	0,032
Nacht 8–8	3730	1002	0,052	1,940	0,090	3,357	0,008	0,298
Summe	6900	1007	0,089	6,170	0,111	7,641	0,009	0,605

---

[1] Durchschnitt aller Hauptportionen bestimmt.

Tabelle VI.

Harnkonzentrierende Wirkung von 10 ccm Hypophysin intravenös (8^h) bei Diabetes insipidus. Fall 1.

Stunde 8. V. 16	Menge	Spez. Gewicht	Kochsalz %	Kochsalz g	Harnstoff %	Harnstoff g
8–9	450	1002	0,092	0,414	0,123	0,554
9–9½	117	1005	0,112	0,131	0,175	0,205
9½–10	—	—	—	—	—	—
10–10½	**45**	**1017**	**0,510**	0,230	**0,850**	0,382
10½–11	22	**1015**	**0,671**	0,148	**0,889**	0,196
11–11½	25	**1013**	**0,575**	0,144	**0,834**	0,209
11½–12	**30**	**1013**	**0,582**	0,175	**0,806**	0,242
12–1	**85**	**1014**	**0,610**	0,519	**0,750**	0,638
1–2	160	**1013**	**0,512**	0,819	**0,735**	1,176
2–3	120	**1012**	**0,435**	0,522	**0,735**	0,882
3–5	370	**1010**	0,205	0,759	0,405	1,499
5–7	420	1006	0,125	0,525	0,325	1,365
7–9	570	1003	0,092	0,524	0,102	0,581
Nacht 9–8	4350	1003	0,062	2,697	0,115	5,003
Summe	6764	1008	0,112	7,607	0,191	12,932

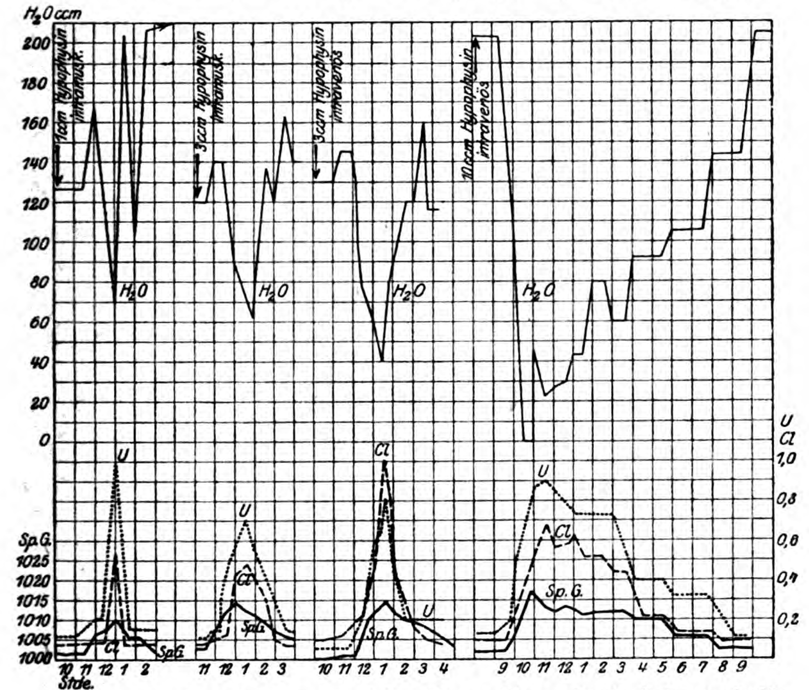


Fig. 1. Kurve 1. Injektion von 1 bis 10 ccm Hypophysin (intramuskulär und intravenös). Harnkonzentrierende Wirkung bei Diabetes insipidus. Unterschied mehr in der Dauer als in der Intensität der Wirkung.

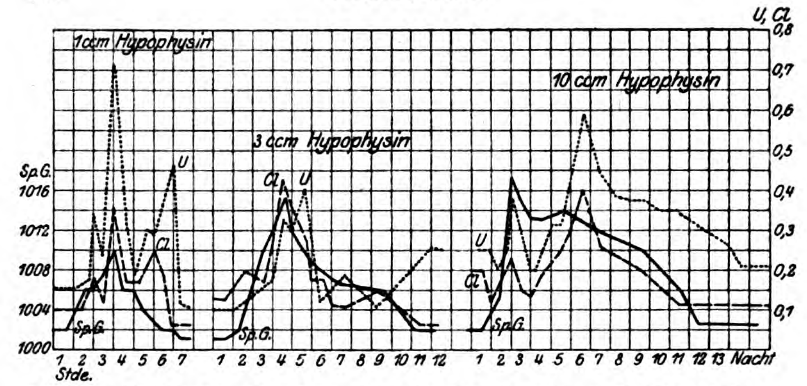


Fig. 2. Kurve 2. Zunahme der absoluten Salz- und Harnstoffausscheidung nach Hypophysininjektion (1/2stündig ausgeschiedene Menge in Gramm).

Diese Versuche haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Die Injektion von Extrakten aus dem Hypophysenhinterlappen führt bei Diabetes insipidus regelmäßig und mit Sicherheit zu einer vorübergehenden Hemmung der Wasserausscheidung und Erhöhung der Harnkonzentration.

2. Diese Hemmung der Wasserausscheidung und Erhöhung der Harnkonzentration geht weit über das Maß dessen hinaus, was beim Konzentrationsversuch durch Dürstenlassen erreicht werden kann und übersteigt auch das Konzentrationsvermögen im Fieber. Dagegen erreicht sie auch bei Anwendung sehr großer Mengen (10 ccm Hypophysenextrakt intravenös) niemals auch nur annähernd den Höchstwert der normalen Konzentrationsfähigkeit eines Gesunden.

3. Bei Injektion kleiner Mengen von Hypophysenextrakt erreicht die Konzentration ihren Höhepunkt in 1 bis 2 Stunden und ist nach 2 bis 3 Stunden wieder auf das alte Niveau abgesunken. Mit steigender Injektionsmenge erhöht sich die Intensität und Dauer der Wirkung, wobei jedoch die Intensität auch durch die größten Mengen nicht über ein Konzentrationsvermögen von 1015 bis 1018 spez. Gew. gesteigert werden kann, während die Dauer der Wirkung mit steigender Menge proportional ansteigt, und zwar bei Injektion von 1 ccm Hypophysenextrakt 2 bis 3 Stunden, von 3 ccm 4 bis 5 Stunden, von 10 ccm ca. 10 Stunden beträgt.

4. Bei Injektion großer Mengen von Hypophysenextrakt kann es vorübergehend auf der Höhe der Wirkung zu Anurie kommen, die jedoch nie länger als $^1/_2$ Stunde anhielt und auch in den später mitzuteilenden Versuchen an Gesunden häufig beobachtet wurde.

5. Die Injektion von Hinterlappenextrakt bewirkte in meinen Versuchen auch eine Erhöhung der ausgeschiedenen absoluten Menge von Kochsalz, Stickstoff und Phosphat, während C. und M. Oehme ein wechselndes Verhalten fanden, das wohl auf Unterschiede in der jeweiligen Molenlage im Organismus zu beziehen ist.

6. Die Tagesmenge des Harns erfährt nur nach Injektion größerer Mengen von Hinterlappenextrakt eine geringe Abnahme, das spez. Gewicht eine geringe Steigerung, bei Injektion kleinerer Mengen jedoch nicht.

7. Verabreichung von Hypophysenextrakt per os selbst in großen Mengen ist ohne Einfluß auf die Harnabsonderung.

8. Die Wirkung der Hypophysentherapie bei Diabetes insipidus ist eine rein symptomatische, die wenige Stunden nach der Injektion aufhört. Eine dauernde Beeinflussung der Erkrankung ist in keinem Falle gelungen.

9. Eine Steigerung der Hypophysinwirkung durch gleichzeitige Injektion von Suprarenin ist nicht möglich. Suprarenin allein erwies sich ebenso wie Histamin (β-Imidazolyläthylamin) als wirkungslos auf die Diurese.

10. Die Injektion selbst großer Mengen von Hypophysenhinterlappenextrakt ist gefahrlos. Als Nebenwirkungen wurden beobachtet: bei subcutaner und intramuskulärer Injektion eine geringe, einige Stunden anhaltende Empfindlichkeit der Injektionsstellen, bei intravenöser Injektion Blässe des Gesichts, mitunter leichtes Übelsein und Schwindelgefühl, anfängliche Pulsbeschleunigung mit geringer Blutdrucksteigerung und nachfolgender Pulsverlangsamung mit geringer Blutdruckerniedrigung.

2. Wirkung des Hypophysenhinterlappenextraktes auf die Diurese bei Gesunden und bei der Rekonvaleszentenpolyurie.

Die Versuche über die Wirkung des Hinterlappenextraktes auf die Diurese bei Gesunden sowie bei Rekonvaleszenten-

polyurie sollen ausführlicher im folgenden Abschnitt besprochen werden, wo die harnkonzentrierende, wasserausscheidungshemmende und salzausscheidungsfördernde Wirkung eines aus dem Hypophysenhinterlappen isolierten Polypeptides nachgewiesen wird. Hier sei nur so viel festgestellt, daß die harnkonzentrierende Wirkung des Hinterlappenextraktes bei Gesunden und bei der Rekonvaleszentenpolyurie ebenso zutage tritt wie beim Diabetes insipidus. Die Resultate bei Gesunden stimmen mit den von W. Frey und Kumpieß sowie C. und M. Oehme nach Pituglandolinjektion gewonnenen Ergebnissen völlig überein.

b) Versuche mit Vorderlappenextrakt.

Für die Versuche mit Vorderlappenextrakt an Gesunden und Wasserharnruhrkranken wurden folgende Präparate verwandt:

1. Hypophysenvorderlappenextrakt (Höchster Farbwerke).
2. Hypophysenvorderlappenextrakt (Freund und Redlich).
3. Ein von mir nach Entfernung der äußeren Schicht des Vorderlappens hergestellter Extrakt aus Rinderhypophyse.

Der Vorderlappen der Rinderhypophyse ist an der Oberseite von einer dünnen Schicht von Epithelzellen überzogen, die der Pars intermedia angehören und sorgfältig abpräpariert werden muß. Geschieht das nicht, so bekommt man in den Vorderlappenextrakt auch Stoffe aus der Pars intermedia und dem Hinterlappen. Darauf beruht es, daß manche Hypophysenvorderlappenextrakte, wie z. B. ein mir von den Höchster Farbwerken freundlicherweise zur Verfügung gestelltes Präparat, eine harnkonzentrierende Wirkung besitzen, die reinen Vorderlappenextrakten nicht zukommt. Ein von der Fabrik für organtherapeutische Präparate Dr. Freund und Dr. Redlich hergestellter Extrakt aus besonders sorgfältig isoliertem Hypophysenvorderlappen sowie ein von mir selbst hergestellter Vorderlappenextrakt zeigten keinerlei Wirkung auf die Diurese.

Die Versuche über die Wirkung des Vorderlappenextraktes bei Diabetes insipidus wurden in der im vorigen Abschnitt beschriebenen Weise durchgeführt, indem nach Injektion von Hypophysenvorderlappenextrakt in $^1/_2$ bis 1stündigen Intervallen die Harnabsonderung untersucht wurde.

Die Versuche beim Gesunden wurden so angestellt, daß die Ausscheidung von $1^1/_2$ l Wasser an einem Tage ohne und

an einem folgenden mit Injektion von Vorderlappenextrakt bestimmt wurde.

Aus einer größeren Zahl von Versuchen an verschiedenen Fällen seien nur die folgenden (Tabelle VII bis IX) mitgeteilt, da die Ergebnisse in allen Fällen übereinstimmend waren.

Tabelle VII.

Wirkung eines reinen Hypophysenvorderlappenextraktes (Freund & Redlich) auf die Diurese bei Diabetes insipidus. Fall 1. Keine Zunahme der Harnkonzentration.

Stunde	Menge	Spez. Gewicht	Kochsalz		Harnstoff	
			%	g	%	g
7–8	182	1004	0,115	0,2093	0,218	0,39676
8–8½	230	1006	0,220	0,5060	0,368	0,84640
8½–9	80	1005	0,216	0,1680	0,225	0,18000
9–9½	100	1005	0,210	0,2100	0,225	0,22500
9½–10	174	1005	0,210	0,3654	0,225	0,39150
10–10½	160	1004	0,064	0,1024	0,210	0,33600
10½–11	260	1004	0,064	0,1664	0,210	0,54600
11–12	500	1002	0,060	0,3000	0,156	0,78000
12–8	2700	1001	0,060	1,6200	0,156	4,21200
Nacht 8–7	4700	1002	0,060	2,8200	0,123	5,78100
Summe	9086	1004	0,072	6,4675	0,1507	13,69466

Tabelle VIII.

Wirkung eines Extraktes aus Vorderlappen und Pars intermedia der Hypophyse bei Diabetes insipidus. Fall 1.
Um 9h 10 ccm Vorderlappenextrakt (Höchst) intramuskulär
Geringe Steigerung der Harnkonzentration.

Stunde	Menge	Spez. Gewicht	Kochsalz		Harnstoff	
			%	g	%	g
8–9	200	1003	0,115	0,230	0,182	0,364
9–9½	152	1006	0,270	0,410	0,300	0,456
9½–10	65	**1010**	**0,551**	0,358	**0,830**	0,540
10–10½	50	**1010**	**0,551**	0,276	**0,820**	0,410
10½–11	55	**1010**	**0,553**	0,304	**0,825**	0,454
11–11½	73	**1009**	**0,551**	0,402	**0,825**	0,602
11½–12	57	1006	0,271	0,154	0,411	0,177
12–1	150	1003	0,102	0,153	0,175	0,263
1–8	2350	1002	0,050	1,175	0,098	0,188
Nacht 8–8	4300	1004	0,075	3,225	0,100	4,300
Summe	7452	1005	0,090	6,687	0,104	7,754

Tabelle IX.

Wirkung von Vorderlappenextrakt auf die Diurese beim Gesunden nach Trinken von $1^1/_2$ l Wasser. Keine Wirkung des reinen Vorderlappenextraktes; Zunahme der Konzentration durch Extrakt aus Vorderlappen und Pars intermedia.

Stunde	Gesunder 1						Gesunder 2					
	Normale Ausscheidung von $1^1/_2$ Liter Wasser		Injekt. von rein. Vorderlappenextrakt		Injekt. von Vorderlappen und Pars interm.		Normale Ausscheidung von $1^1/_2$ Liter Wasser		Injekt. von rein. Vorderlappenextrakt		Injekt. von Vorderlappen und Pars interm.	
	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht
1.	500	1002	250	1004	**90**	**1022**	50	1005	350	1004	**70**	**1006**
2.	1000	1001	550	1001	**190**	**1018**	750	1000	250	1001	600	1001
3.	500	1002	350	1003	700	1002	400	1001	600	1003	450	1002
4.	125	1010	1000	1001	400	1002	425	1002	375	1003	200	1007
Summe	2125	1003	2150	1003	1380	1006	1625	1002	1575	1003	1320	1005

Diese Versuche ergeben, daß der Vorderlappen der Hypophyse keine Stoffe enthält, die eine Hemmung der Wasserausscheidung und Zunahme der Harnkonzentration bewirken. Dagegen sind solche Stoffe in der Pars intermedia ebenso wie im Hinterlappen enthalten.

c) Die Wirkung der isolierten Substanzen aus dem Hypophysenhinterlappen auf die Harnabsonderung.

Aus dem eiweißfreien Hypophysenhinterlappenextrakt lassen sich mit Hilfe fraktionierter Fällung verschiedene Substanzen isolieren, deren Wirksamkeit auf die Harnabsonderung in den folgenden Versuchen an Gesunden und an Wasserharnruhrkranken geprüft wurde. Die Isolierung dieser Substanzen geschah nach den folgenden im Laboratorium der Höchster Farbwerke ausgearbeiteten Verfahren:

Wäßrige Extrakte aus den Hinterlappen von Rinderhypophysen werden enteiweißt und das eiweißfreie Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert und mit Barytlauge zerlegt. Die überstehende Flüssigkeit wird filtriert, der überschüssige Baryt durch Schwefelsäure gefällt und die schwefelsaure Lösung im Vakuum eingedampft. Hierbei krystallisiert ein gelblich gefärbtes schwefelsaures Salz aus, das sich leicht mit schwachsaurer Reaktion in Wasser löst, in Alkohol, Äther, Chloroform und Aceton da-

gegen schwer löslich resp. unlöslich ist. Dieses schwefelsaure Salz stellt das Hypophysin dar, das die physiologisch wirksamen Bestandteile des Hypophysenhinterlappens enthält. (Wirkung auf Uterus, Herz und Gefäße, Nieren.) Das Hypophysin ist linksdrehend, gibt in alkalischer Lösung bei Zusatz von diazotierter Sulfanilsäurelösung eine Rotfärbung (Paulysche Reaktion) und mit Kupfersulfat Violettfärbung (Biuretreaktion), in neutraler Lösung mit Ninhydrin beim Kochen Violettfärbung.

Dieses Hypophysin ist jedoch keine einheitliche Substanz, sondern läßt sich durch wiederholte fraktionierte Fällung mit Pikrinsäure und Methylalkohol in eine Reihe von Bestandteilen zerlegen, die ihrerseits jedoch als einheitliche Körper angesehen werden müssen.

1. Fraktion I bildet mit Pikrinsäure ein in Wasser schwerlösliches Salz. Das schwefelsaure Salz ist dagegen in Wasser leicht löslich, schwer löslich in Alkohol, Äther, Aceton, optisch linksdrehend ($[\alpha]_D = -54{,}02^0$) und gibt positive Paulysche, Biuret- und Ninhydrinreaktion.

2. Fraktion II bildet ein in Wasser leicht lösliches pikrinsaures Salz. Auch das schwefelsaure Salz ist leicht wasserlöslich, dagegen schwer löslich in Alkohol, Äther und Aceton und Chloroform. Die wäßrige Lösung ist linksdrehend ($[\alpha]_D = -27{,}17^0$), farblos und gibt schwachsaure Reaktion. Die Paulysche, Biuret- und Ninhydrinreaktion sind positiv. Der Körper hat den Charakter eines Polypeptides und spaltet beim Zusammenbringen mit Alkali sofort eine flüchtige Aminbase ab.

3. Fraktion III ist im Gegensatz zu Fraktion I und II leicht löslich in Methylalkohol. Ebenso ist es leicht löslich in Wasser, dagegen schwer löslich in reinem Äthylalkohol, Äther und Aceton. Das optische Drehungsvermögen beträgt $\alpha_{[D]} = -39{,}25^0$. Das pikrinsaure Salz ist ebenso wie das schwefelsaure Salz leicht wasserlöslich. Die Paulysche, Biuret- und Ninhydrinreaktion sind positiv.

4. Fraktion IV wird gewonnen, indem die nach fraktionierter Ausfällung von Fraktion I, II und III zurückbleibende Mutterlauge im Vakuum eingedampft wird. Es bleibt dabei eine spröde, glasartige Masse zurück, die stark hygroskopisch ist, sich in Wasser und Alkohol leicht, in Äther und Aceton schwer löst. Das optische Drehungsvermögen beträgt $\alpha_{[D]} = -21{,}26^0$. Die Paulysche Reaktion ist positiv, die Ninhydrin- und Biuretreaktion negativ.

Mit diesen aus dem Hypophysenhinterlappen isolierten Substanzen wurden Versuche angestellt, um ihren Einfluß auf die Diurese bei Diabetes insipidus-Kranken und bei Gesunden zu prüfen. Die Versuche wurden hier so ausgeführt, daß nach Injektion der betr. Substanz in wäßriger Lösung bei Diabetes-insipidus-Kranken die $^1/_2$- bis 1stündige Harnabsonderung bestimmt wurde (Menge, spez. Gewicht, Kochsalz und Harnstoff). Eine Zunahme der Harnkonzentration

konnte bei dem unter frei gewählter Flüssigkeitszufuhr nur in sehr engen Grenzen schwankenden spez. Gewicht (1001 bis 1008) leicht erkannt werden.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabellen X bis XVIII dargestellt und in den Kurven 3 bis 5 veranschaulicht.

Tabelle X.

3 ccm Hypophysenhinterlappen, Fraktion I, intramuskulär (9h). Fall 1.

Stunde 4. IV. 16	Menge	Spez. Gewicht	Kochsalz		Harnstoff	
			%	g	%	g
8–9	220	1004	0,087	0,191	0,125	0,275
9–9½	100	1007	0,362	0,362	0,410	0,410
9½–10	**45**	**1009**	**0,585**	0,263	**0,650**	0,293
10–10½	**47**	**1009**	**0,585**	0,275	**0,725**	0,341
10½–11	**70**	1003	0,298	0,209	0,380	0,266
11–12	220	1003	0,186	0,409	0,200	0,440
12–1	450	1000,5	0,168	0,761	0,075	0,338
1–2	550	1001	0,110	0,605	0,078	0,429
2–8	3400	1002	0,072	2,448	0,108	3,672
Nacht 8–8	4200	1001	0,072	3,024	0,108	4,536
Summe	9402	1004	0,091	8,545	0,117	11,000

Tabelle XI.

3 ccm Hypophysenhinterlappen, Fraktion II, intramuskulär (9h). Fall 1.

Stunde 5. IV. 16	Menge	Spez. Gewicht	Kochsalz		Harnstoff	
			%	g	%	g
8–9	230	1002	0,072	0,166	0,118	0,271
9–9½	**92**	1008	0,454	0,418	0,454	0,418
9½–10	**50**	**1013**	**0,517**	0,259	**0,750**	0,375
10–10½	**30**	**1013**	**0,854**	0,256	**0,938**	0,281
10½–11	**47**	**1013**	**0,813**	0,382	**0,963**	0,453
11–11½	**55**	**1015**	**0,813**	0,447	**0,975**	0,566
11½–12	**48**	**1016**	**0,972**	0,467	**0,985**	0,473
12–1	230	**1010**	**0,642**	1,477	**0,852**	1,960
1–2	280	1007	**0,560**	1,568	**0,652**	1,826
2–3	600	1004	0,442	2,652	0,375	2,250
3–5	310	1002	0,117	0,363	0,268	0,831
5–8	470	1001	0,077	0,362	0,175	0,823
Nacht 8–8	3800	1003	0,062	2,356	0,131	4,978
Summe	6242	1008	0,179	11,173	0,248	15,475

Tabelle XII.

3 ccm Hypophysenhinterlappenextrakt, Fraktion III, intramuskulär (9^h). Fall 1.

Stunde 14. IV. 16	Menge	Spez. Gewicht	Kochsalz %	Kochsalz g	Harnstoff %	Harnstoff g
8–9	190	1002	0,078	0,148	0,115	0,219
9–9½	132	**1005**	**0,115**	0,152	**0,186**	0,246
9½–10	170	1005	0,115	0,196	0,186	0,316
10–10½	77	1002	0,082	0,063	0,145	0,112
10½–11	140	1004	0,105	0,147	0,145	0,203
11½–12	160	1005	0,105	0,168	0,145	0,232
12–1	215	1004	0,100	0,215	0,138	0,297
1–2	350	1004	0,100	0,350	0,138	0,483
2–3	450	1003	0,100	0,450	0,138	0,621
3–4	450	1001	0,072	0,324	0,112	0,504
4–5	400	1001	0,072	0,288	0,112	0,448
5–8	1100	1003	0,066	0,726	0,112	1,232
Nacht 8–8	5100	1002	0,066	0,726	0,112	1,232
Summe	8934	1003	0,080	6,593	0,125	10,625

Tabelle XIII.

3 ccm Hypophysenhinterlappenextract, Fraktion IV intramuskulär (12^h). Fall 1.

Stunde 10. IV. 16	Menge	Spez. Gewicht	Kochsalz %	Kochsalz g	Harnstoff %	Harnstoff g
8–12	1150	1004	0,081	0,932	0,140	1,610
12–1	240	1004	0,076	0,182	0,140	0,336
1–1½	220	1007	0,462	1,016	0,413	0,909
1½–2	120	1008	**0,737**	0,884	**0,554**	0,665
2–2½	120	**1010**	**0,858**	1,030	**0,638**	0,766
2½–3	120	**1010**	**0,841**	1,009	**0,625**	0,750
3–3½	130	1009	**0,803**	1,044	**0,638**	0,829
3½–4	92	1009	**0,781**	0,719	**0,618**	0,569
4–5	170	1006	0,385	1,040	0,375	1,013
5–6	340	1002	0,091	0,309	0,125	0,425
6–8	690	1004	0,081	0,559	0,138	0,952
Nacht (8–8)	4310	1003	0,061	2,629	0,115	4,957
Summe	7802	1005	0,146	11,353	0,177	13,781

Tabelle XIV.

4 ccm Hypophysenhinterlappenextrakt (je 1 ccm Fraktion I, II, III und IV) intramuskulär (9h). Fall 1.

Stunde 11. IV. 16	Menge	Spez. Gewicht	Kochsalz %	Kochsalz g	Harnstoff %	Harnstoff g
8–9	145	1002	0,072	0,104	0,100	0,145
9–10	132	1005	0,198	0,261	0,228	0,301
10–10½	**40**	**1010**	0,204	0,292	**0,675**	0,270
10½–11	**25**	**1014**	**0,994**	0,249	**0,875**	0,219
11–11½	**75**	**1015**	**0,952**	0,714	**0,806**	0,805
11½–12	130	**1013**	**0,899**	1,168	**0,725**	0,943
12–12½	90	**1012**	**0,715**	0,644	**0,700**	0,630
12½–1	120	**1011**	**0,545**	0,654	**0,575**	0,690
1–2	250	1007	0,321	0,803	0,335	0,838
2–3	1000	1006	0,321	0,321	0,335	0,335
3–8	1000	1002	0,078	0,780	0,122	1,220
Nacht 8–8	3850	1003	0,078	3,003	0,122	**4,697**
Summe	5957	1007	0,147	8,994	0,181	10,893

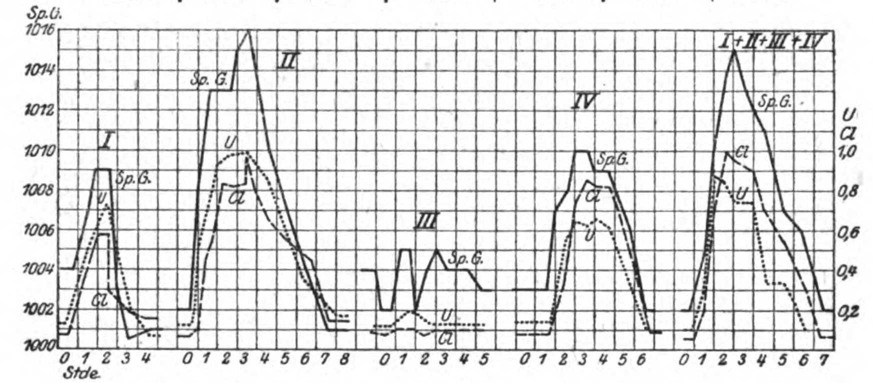


Fig. 3. Kurve 3. Wirkung von je 3 ccm Hypophysenhinterlappenextrakt Fraktion I bis IV auf die Harnkonzentration bei Diabetes insipidus. (Fall 1.)

Tabelle XV.

5 ccm Hypophysenhinterlappenextrakt Fraktion I intramuskulär (11h). Fall 2.

Stunde 9. XI. 16	Harn-Menge	Spez. Gewicht	NaCl %	NaCl g	U %	U g
8–11	1000	1003	0,074	0,740	0,130	1,200
11–12	400	1004	0,075	0,300	0,250	1,000
12–1	**200**	**1006**	**0,377**	0,754	**0,338**	0,676
1–2	375	1003	0,180	0,675	0,135	0,506
2–3	625	1003	0,074	0,463	0,130	0,813
3–4	500	1002	0,078	0,390	0,130	0,650
4–6	825	1003	0,075	0,619	0,130	1,073
6–8	750	1003	0,074	0,555	0,125	0,945
8–8	4100	1003	0,074	3,034	0,130	5,330
Summe	8775	1003	0,086	7,530	0,140	12,193

Tabelle XVI.

5 ccm Hypophysenhinterlappenextrakt **Fraktion II muskulär** (10½ h).
Fall 2.

Stunde 11. XI. 16	Harnmenge	Spez. Gewicht	NaCl %	NaCl g	U %	U g
8–10½	1200	1002	0,145	1,740	0,275	3,300
10½–11½	200	1005	0,384	0,768	0,450	0,900
11½–12½	—	—	—	—	—	—
12½–1½	**100**	**1018**	**1,053**	1,053	**1,450**	1,450
1½–2½	**125**	**1012**	**0,840**	1,050	**0,805**	1,006
2½–3½	225	1004	0,400	0,900	0,500	1,125
3½–4½	525	1002	0,080	0,420	0,125	0,656
4½–5½	400	1002	0,080	0,320	0,125	0,500
5½–6½	525	1001	0,052	0,273	0,1120	0,588
6½–7½	525	1003	0,071	0,373	0,125	0,656
7½–8½	850	1003	0,071	0,604	0,125	1,063
Nacht 8½–8	4100	1005	0,080	3,280	0,132	5,412
Summe	8775	1007	0,123	10,781	0,190	16,656

Tabelle XVII.

5 ccm Hypophysenhinterlappenextrakt **Fraktion III intramuskulär** (11 h). Fall 2.

Stunde 28. X. 16	Harnmenge	Spez. Gewicht	NaCl %	NaCl g	U %	U g
8–11	500	1002	0,090	0,450	0,120	0,600
11–12	450	1001	0,090	0,405	0,125	0,563
12–1	**200**	**1008**	**0,319**	0,638	**0,600**	1,200
1–2	—	—	—	—	—	—
2–3	400	1006	0,214	0,856	**0,550**	2,200
3–4	600	1001	0,071	0,426	0,225	1,350
4–6	600	1006	0,163	0,978	0,225	1,350
6–8	1000	1004	0,187	1,870	0,200	2,000
8–8	5300	1003	0,070	3,710	0,115	6,095
Summe	9050	1003	0,103	9,333	0,170	15,358

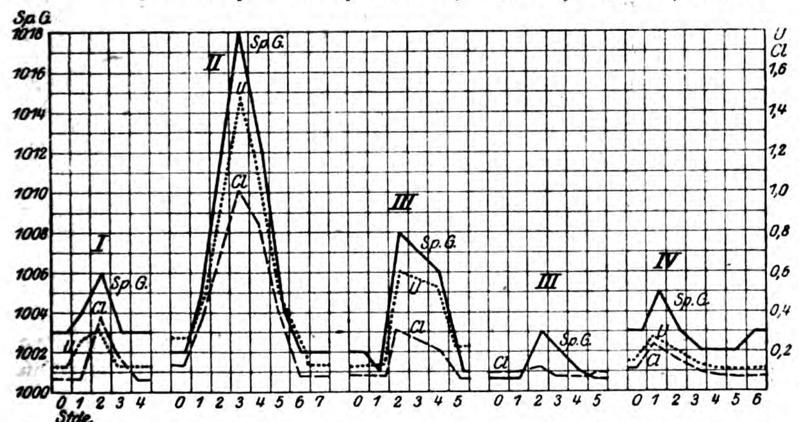


Fig. 4. Kurve 4. Wirkung von je 5 ccm Fraktion I bis IV auf die Harnkonzentration bei Diabetes insipidus. (Fall 2.)

Tabelle XVIII.

5 ccm Hypophysenhinterlappenextrakt Fraktion IV intramuskulär (9^h). Fall 2.

Stunde 8. XI. 16	Harnmenge	Spez. Gewicht	NaCl %	NaCl g	U %	U g
8–9	400	1003	0,116	0,464	0,150	0,600
9–10	150	1005	0,235	0,353	0,265	0,398
10–11	300	1003	0,162	0,486	0,150	0,450
11–12	475	1002	0,106	0,504	0,130	0,618
12–1	400	1002	0,080	0,320	0,112	0,448
1–2	500	1002	0,080	0,400	0,112	0,560
2–3	600	1003	0,080	0,480	0,112	0,672
3–4	400	1004	0,065	0,260	0,105	0,420
4–5	550	1003	0,065	0,358	0,105	0,578
5–6	500	1004	0,065	0,325	0,105	0,525
6–7	500	1002	0,074	0,370	0,120	0,600
7–8	300	1003	0,074	0,222	0,120	0,360
Nacht 8–8	3875	1003	0,074	2,867	0,120	4,650
Summe	8950	1003	0,083	7,409	0,122	10,879

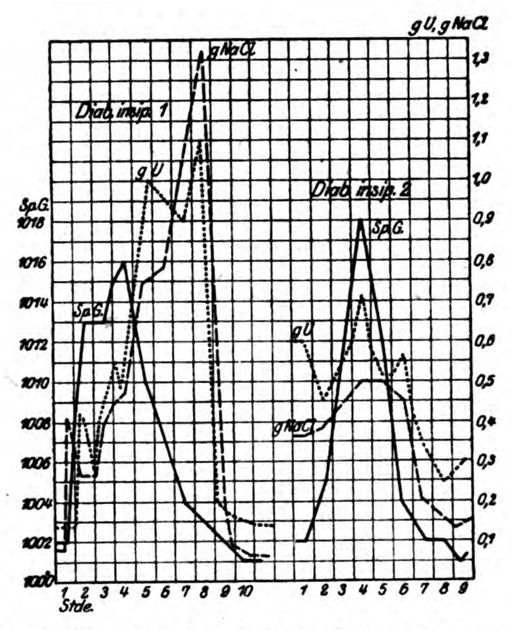


Fig. 5. Kurve 5. Zunahme der absoluten halbstündig ausgeschiedenen Kochsalz- und Harnstoffmenge bei Diabetes insipidus nach Injektion von Fraktion II.

2. Harnkonzentrierende Wirkung des aus der Hypophyse isolierten Polypeptides bei nervöser Polydipsie und Rekonvaleszentenpolyurie.

Auch bei der nervösen Polydipsie und der Rekonvaleszentenpolyurie zeigte sich die harnkonzentrierende Wirkung des aus dem Hinterlappen der Hypophyse isolierten Polypeptides Fraktion II, während die übrigen Fraktionen keine eindeutige Wirkung erkennen ließen. Allerdings ist die Beurteilung der Versuche an diesen Kranken nicht so einwandfrei möglich wie beim Diabetes-insipidus-Kranken, weil bei ihm das Konzentrationsvermögen erhalten ist und daher bei Beschränkung der Wasserzufuhr auch normalerweise eine genügende Konzentration eintritt, während bei freigewählter Flüssigkeitszufuhr sehr oft die starke Polydipsie den Kranken zu einer Aufnahme größerer Wassermengen als nötig veranlaßt und dadurch die konzentrierende Wirkung sowohl des Hypophysins wie seiner isolierten Fraktionen verdeckt wird. Trotzdem lassen auch diese Versuche die harnkonzentrierende Wirkung der genannten Präparate erkennen.

Tabelle XIX.

Harnkonzentrierende Wirkung des Polypeptides „Fraktion II" bei Rekonvaleszentenpolyurie (Stundenversuch). (9^h.) 5 ccm Fraktion II intramuskulär.

Stunde	Harnmenge	Spez. Gewicht	NaCl		N	
			%	g	%	g
8–9	160	1007	0,101	0,162	0,286	0,618
9–10	200	1010	0,175	0,230	0,413	0,826
10–10½	150	1015	0,135	0,203	0,596	0,894
10½–11	100	1010	0,135	0,135	0,411	0,411
11–11½	188	1010	0,132	0,248	0,376	0,707
11½–12	55	1015	0,298	0,164	0,757	0,416
12–12½	95	1025	0,995	0,945	1,251	1,188
12½–1	76	1014	0,313	0,238	0,641	0,487
1–1½	93	1014	0,210	0,195	0,574	0,534
1½–2	72	1014	0,200	0,144	0,514	0,370
2–2½	123	1014	0,158	0,194	0,514	0,632
2½–3	143	1015	0,566	0,809	0,772	1,104
3–3½	114	1014	0,165	0,188	0,471	0,537
3½–4	129	1014	0,143	0,184	0,504	0,650
4–8	155	1015	0,178	0,276	0,628	0,973
Nacht 8–8	1120	1011	0,119	1,333	0,401	4,491
Summe	2973	1013	0,190	5,648	0,499	14,838

3. Harnkonzentrierende Wirkung des Hypophysenpolypeptides beim Gesunden.

Sehr deutlich tritt die harnkonzentrierende Wirkung des aus dem Hypophysenhinterlappen gewonnenen Polypeptides „Fraktion II“ beim Gesunden zutage, während die übrigen Fraktionen eine sehr viel geringere und nicht so eindeutige Wirkung erkennen lassen.

Um die Wirkung auf die Diurese eines Mittels beim Gesunden darzutun, ist es nötig, zuerst eine Vergleichskurve der Harnausscheidung zu gewinnen. Hierfür kommen zwei Möglichkeiten in Betracht.

1. Durch halbstündige Verabreichung von $^1/_4$ l Wasser kann man eine annähernd gleichmäßige Diurese durch mehrere Stunden hindurch erzeugen. Injiziert man während des Verlaufs dieser gleichmäßigen Kurve Hypophysenextrakt, so zeigt sich deutlich der durch die harnkonzentrierende Wirkung bedingte Ausschlag (Tabelle XX und Kurve 6.).

Tabelle XX.

Harnkonzentrierende Wirkung einer Injektion von 3 ccm Hypophysin Fraktion II (12^h) bei einem Gesunden (halbstündlich $^1/_4$ l Wasser).

Stunde 10. X. 17	Harnmenge	Spez. Gewicht	NaCl %	NaCl g	N %	N g	P_2O_5 %	P_2O_5 g
8–9	560	1004	0,142	0,795	0,150	0,840	0,010	0,056
9–10	720	1003	0,120	0,864	0,145	1,044	0,007	0,050
10–11	380	1006	0,165	0,627	0,193	0,733	0,012	0,046
11–12	550	1004	0,110	0,605	0,125	0,688	0,008	0,044
12–1	110	1013	0,468	0,515	0,525	0,578	0,068	0,075
1–2	**55**	**1022**	**1,025**	0,568	**1,100**	0,605	**0,180**	0,099
2–3	**70**	**1020**	**0,910**	0,637	**0,905**	0,634	**0,180**	0,126
3–4	**85**	**1019**	**0,742**	0,631	**0,725**	0,616	**0,095**	0,081
4–5	145	1010	0,356	0,516	0,375	0,544	0,042	0,061
5–6	320	1006	0,180	0,576	0,193	0,618	0,010	0,032
6–7	540	1004	0,110	0,594	0,165	0,891	0,009	0,049
7–8	500	1005	0,110	0,550	0,150	0,750	0,009	0,045

2. Noch deutlicher wird dieser Ausschlag, wenn man als Vergleichskurve die 4stündige Ausscheidung eines auf einmal getrunkenen Quantums von $1^1/_2$ bis 2 l Wasser, d. h. also den zur Nierenfunktionsprüfung gebräuchlichen Wasserversuch nimmt. Macht man diesen Versuch, der unter normalen Verhältnissen beim gleichen Menschen immer annähernd gleiche Ergebnisse hat, einmal ohne und einmal mit Injektion des Hypophysenpolypeptides, so tritt aufs deutlichste die Hemmung der Wasserausscheidung und die Zunahme der Harnkonzentration hierbei zutage. Tabelle XXI veranschaulicht dieses Ergebnis an einigen aus einer größeren Reihe ausgewählten Versuchen.

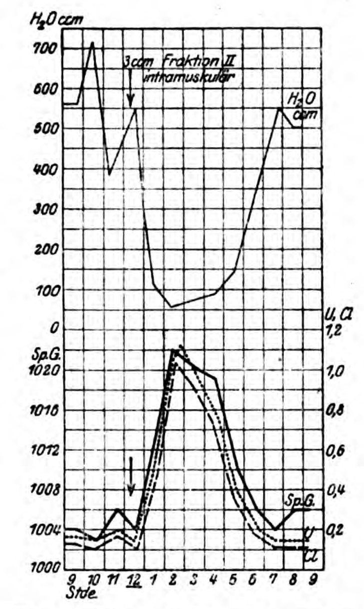


Fig. 6. Kurve 6. Harnkonzentrierende Wirkung von Hypophysenextrakt Fraktion II beim Gesunden unter halbstündiger Aufnahme von $^1/_4$ l Wasser.

Tabelle XXI.

Harnkonzentrierende Wirkung des Polypeptides „Fraktion II" aus dem Hypophysenhinterlappen beim Gesunden. Hemmung der Wasserausscheidung und Zunahme der Konzentration nach Wassertrinken (Verdünnungsversuch).

Stunde	Gesunder 1. 2000 ccm Wasser getrunken				Gesunder 2 1700 ccm Wasser getrunken			
	Normal		2 ccm Fraktion II		Normal		2 ccm Fraktion II	
	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht
8–9	600	1002	—	—	420	1005	120	**1010**
9–10	700	1001	—	—	600	1001	200	1007
10–11	450	1003	250	1005	650	1000,5	100	**1014**
11–12	255	1004	100	**1020**	140	1009	200	**1013**
Summe	**2005**	**1003**	**350**	**1012**	**1810**	**1004**	**620**	**1011**

Stunde	Gesunder 5 1500 ccm Wasser getrunken				Gesunder 6 1500 ccm Wasser getrunken			
	Normal		2 ccm Fraktion II		Normal		2 ccm Fraktion II	
	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht	Harnmenge	Spez. Gewicht
8–9	250	1005	150	**1013**	300	1005	—	—
9–10	750	1004	100	**1017**	700	1002	150	**1013**
10–11	400	1003	200	**1014**	350	1002	150	**1015**
11–12	390	1007	450	1005	400	1008	500	1006
Summe	**1790**	**1005**	**900**	**1012**	**1750**	**1004**	**800**	**1010**

Vergleichen wir diese Ergebnisse mit der Wirkung der isolierten Bestandteile des Hypophysenhinterlappens auf Blutdruck, Atmung und Uterus, wie sie aus den Untersuchungen von Führer[1]) an Tieren, sowie aus meinen Untersuchungen bezüglich der Atmung, des Blutdrucks und der Herztätigkeit am Menschen[2]) hervorgehen, so ergibt sich folgendes:

1. Fraktion I: Hat zwar mäßig starke Wirkung auf den Blutdruck, jedoch nur sehr geringe Wirkung auf Atmung, Uterus und Diurese.

2. Fraktion II: Hat starke Wirkung auf Blutdruck, Atmung, Uterus und die stärkste Wirkung auf die Diurese.

3. Fraktion III: Hat starke Wirkung auf Blutdruck, Atmung, die stärkste Wirkung auf die Gebärmutter, dagegen keine auf die Diurese.

4. Fraktion IV: Besitzt nur schwache Wirkung auf Blutdruck, Atmung und Diurese, dagegen starke Gebärmutterwirkung.

Tabellarisch zusammengefaßt verhält sich also die Wirkung der isolierten Hinterlappensubstanzen folgendermaßen:

---

[1]) Führer, Über die isolierten wirksamen Substanzen der Hypophyse. Deutsche med. Wochenschr. 11, 1913. — Pharmakologische Untersuchungen über die wirksamen Bestandteile der Hypophyse. Zeitschr. f. d. gesamte experiment. Med. 1, H. 5, 1913. — Die Hypophyse und ihre wirksamen Bestandteile. Berl. klin. Wochenschr. 6, 1914.

[2]) Leschke, Beiträge zur klinischen Pathologie des Zwischenhirns. I. Zeitschr. f. klin. Med. 87, 1919

Substanz	Atmung	Blutdruck	Uterus	Harn-konzentration
Fraktion I	+	++	+	+
Fraktion II	+++	+++	+++	++++
Fraktion III	++++	+++	++++	0 – (+)
Fraktion IV	+	+	+++	+

Zusammenfassung.

1. Extrakte aus dem Vorderlappen der Hypophyse haben keine Wirkung auf die Harnabsonderung, während solche aus dem mittleren (pars intermedia) und hinteren Teil (pars nervosa) sowohl beim Gesunden wie beim Diabetes-insipidus-Kranken zu einer Hemmung der Wasser- und Förderung der Molendiurese führen, wobei stets die prozentuale Konzentration der Harnbestandteile, in den vorliegenden Versuchen auch ihre in der Zeiteinheit ausgeschiedene absolute Menge zunimmt.

2. Diese Wirkung auf die Diurese tritt nicht nach Eingabe per os, sondern nur nach Injektion des Extraktes ein. Injektion steigender Mengen beeinflußt mehr die Dauer als die Intensität der Wirkung. Eine dauernde Beeinflussung der Diurese bei Diabetes insipidus gelingt nicht, vielmehr erschöpft sich die Wirkung nach wenigen Stunden.

3. Aus dem Hinterlappen der Hypophyse läßt sich eine krystallisierte Substanz (Fraktion II) von Polypeptidcharakter isolieren, die die Paulysche, Biuret- und Ninhydrinreaktion gibt, mit Alkali eine flüchtige Aminbase abspaltet, sich in Wasser mit schwachsaurer Reaktion leicht löst, in anderen Lösungsmitteln dagegen nicht und linksdrehend ist. Dieser Substanz kommt das Vermögen zu, bei Gesunden wie bei Fällen von Diabetes insipidus, Rekonvaleszentenpolyurie und Nierenentzündung eine Abnahme der Wasserausscheidung und Zunahme der prozentualen und absoluten Molenausscheidung zu bewirken.

4. Die übrigen aus dem Hinterlappen isolierten Substanzen (Fraktion I, III und IV) besitzen keine oder nur geringe Wirkung auf die Harnkonzentration.

5. Die physiologischen Wirkungen der verschie-

denen Substanzen des Hypophysenhinterlappens gehen nicht miteinander parallel.

Die Wirkung auf die Atmung kommt Fraktion II und III zu, die auf Herztätigkeit und Blutdruck Fraktion I bis III, am stärksten Fraktion II und III, die auf den Uterus Fraktion II bis IV, am stärksten Fraktion III, die auf die Harnabsonderung Fraktion II.

6. Durch Steigerung der injizierten Menge von Fraktion II läßt sich ebensowenig wie durch Kombination mit den übrigen Bestandteilen des Hinterlappens eine Steigerung der Harnkonzentration bei Diabetes insipidus über ein gewisses Maß hinaus erzielen, das weit entfernt ist (spez. Gew. 1016) von dem Maximum für die normale Konzentrationsfähigkeit (spez. Gewicht 1032).

7. Histamin (β-Imidazolyläthylamin) und Suprarenin haben keine nennenswerte Wirkung auf die Harnabsonderung.

Darstellung und physiologische Wirkung einiger Mekonsäurederivate.

Von

L. Lautenschläger.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. B.)

(Eingegangen am 6. Mai 1919.)

Mekonsäure ist noch in größeren Dosen physiologisch unwirksam. 4 g dieser Säure werden vom Kaninchen (2 kg) ohne schädliche Wirkung ertragen; per os oder subcutan gegeben, lassen sich noch keine Lähmungserscheinungen wahrnehmen. Die Säure wird vom Warmblüter scheinbar sehr rasch und leicht im Körper oxydiert; denn im Harn der Tiere, die mit Mekonsäure gefüttert wurden, sind die für Mekonsäure charakteristischen Reaktionen (Rotfärbung mit Eisenchlorid, Violettfärbung mit Benzidintetrazotat[1]) nicht mehr zu beobachten.

Auch vom Frosch werden größere Mengen dieser Säure noch ertragen. 300 mg rufen bei ihm (50 g-Frosch) eine schwache Lähmung hervor, die nach etwa 1 bis 2 Stunden wieder völlig verschwindet. Erst 600 bis 700 mg wirken beim Frosch letal; hierbei treten zuerst Lähmungserscheinungen auf, dann bleibt das Tier längere Zeit betäubt und nach etwa 5 bis 6 Stunden erfolgt der Tod. Das Herz steht in Diastole still; im abgepreßten Harn läßt sich Mekonsäure nachweisen.

Die gleiche Wirkung zeigt die Säure, wenn man das freie Wasserstoffatom ihrer Hydroxylgruppe durch Säureradikale oder Äthergruppen verschließt.

---

[1]) Diese Reaktion habe ich gelegentlich einer Untersuchung über die Diazoreaktion der Alkaloide aufgefunden.

Durch Kochen der Säure mit Acetylchlorid wurde der Essigsäureester dargestellt.

```
          O·OCCH3
         /
        C=====C — COOH¹)
       /       \
      C = O     O
       \       /
        CH====C — COOH.
```

Dieser wirkt ebenso wie die freie Säure in größeren Mengen beim Frosch schwach lähmend; beim Kaninchen ist die Substanz ohne Wirkung.

Auch die Benzoylverbindung, die durch Kochen der Säure mit Benzoylchlorid erhalten wurde

```
          O·OC·C6H5
         /
        C===C—COOH
       /     \
      C=O     O
       \     /
        CH=C—COOH
```

und die aliphatischen Äther, die durch Verseifen der entsprechenden Ester dargestellt wurden,

```
      O·C2H5                      O·C3H7
     /                           /
    C===C—COOH                  C===C—COOH
   /     \                     /     \
  C=O     O                   C=O     O
   \     /                     \     /
    CH=C—COOH                   CH=C—COOH
    Äthyläther                  Propyläther
```

können als physiologisch unwirksame Körper angesehen werden.

Eine stärkere Lähmung läßt sich beim Frosch erreichen,

---

[1]) Bei der Formulierung dieser Derivate habe ich der Mekonsäure die Konstitution eines Pyronderivates zugrunde gelegt, wie man früher nach den Arbeiten von Peratoner und Leonardi (Gaz. chim. ital. **30** I, 555) allgemein annahm. Neuerdings schreibt Borsche (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **49**, 2538 u. f.) dieser Säure die Konstitution einer aliphatischen Verbindung (Dihydrat der Oxyacetondioxalsäure) zu, während A. Atterberg ein Furfuranderivat annimmt (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **13**, 879 bis 883). Meine Versuche können keineswegs als sichere Grundlage für die eine oder andere Annahme dieser Konstitutionsformeln dienen.

wenn man die eine oder beide Carboxylgruppen der Mekonsäure verestert. Auch hier zeigen die Äthyl- und Propylderivate ähnlich vieler anderer Schlafmittel die stärkste narkotische Wirkung, während die höheren aliphatischen und aromatischen Ester schwächer wirken.

Diese Ester lassen sich alle mit bekannten Methoden erhalten; man erhitzt die Säuren am Rückflußkühler mit den entsprechenden Alkoholen, wobei man Salzsäuregas oder konzentrierte Schwefelsäure als Kondensationsmittel mit Vorteil verwendet. Je nach der Erhitzungsdauer erhält man hierbei die sauren oder neutralen Ester.

Der saure Methylester der Mekonsäure

```
      OH(Na)
     /
    C===C—CO·OCH3
   /     \
  C=O     O
   \     /
    CH=C—COOH(Na)
```

wirkt etwas stärker lähmend als die freie Säure. 100 mg dieser Verbindung in wäßriger Lösung ihres Natriumsalzes in den Brustlymphsack des Frosches injiziert, rufen schwache Lähmung hervor, die nach 2 bis 3 Stunden wieder vollständig verschwindet[1]).

Der neutrale Methylester

```
      OH(Na)
     /
    C===C—CO·OCH3
   /     \
  C=O     O
   \     /
    CH=C—CO·OCH3
```

wirkt entsprechend stärker; 50 mg rufen beim Frosch schwache Lähmung hervor, die mehrere Stunden anhält.

Der neutrale Äthylester von gleicher Konstitution wirkt, in der gleichen Menge wie das Methylderivat gegeben, beim Frosch tödlich. Nach Injektion in den Brustlymphsack beginnt nach $^1/_2$ Stunde die Lähmung, nach 4 bis 5 Stunden ist das Tier

---

[1]) Sämtliche angegebenen Versuche beziehen sich auf 50 g Frosch

tot. 25 mg wirken über kurze Zeit betäubend, 40 mg rufen Lähmung und Betäubung hervor, die 1 Tag anhält.

Am stärksten von dieser Gruppe wirkt der neutrale Propylester; eine Dosis von 2 bis 3 mg lähmen und betäuben einen Frosch für 1 bis 2 Stunden. Die maximale Dosis sind 15 mg, die letale Dosis 20 mg (diastolischer Herzstillstand).

Die sauren Ester dieser beiden Verbindungen wirken entsprechend schwächer.

Die Wirkung des Isobutyl-, Isoamyl- und Phenylesters sind ungefähr derjenigen des Methylesters gleich.

Beim Kaninchen sind alle diese Verbindungen unwirksam. 3 g der wäßrigen Lösung des Natriumsalzes von Äthylester und Propylester wurden subcutan und per os gegeben.

Mit den Ätherverbindungen dieser Ester

```
      O·R
     /
    C===C—COOR
   /     \
  C=O     O
   \     /
    CH=C—COOR
```

wurden ebenfalls Versuche angestellt. Sie wirken nicht stärker als die Ester, sind nur in Wasser unlöslich, deshalb schlechter zu verwenden. Sie wurden aus den entsprechenden Silbersalzen der Ester durch Kochen mit Halogenalkyl dargestellt

Die Diazofarbstoffe der Ester

```
      OH
     /
    C===C—COOR
   /     \
  C=O     O
   \     /
    C===C—COOR
    |
    N=N·R
```

wirken wie die Ester selbst; in der Lymphbahn ist der Farbstoff deutlich wahrzunehmen, im Gehirn, Rückenmark usw. nicht mehr zu erkennen.

Die Farbstoffe werden durch Kuppeln der Mekonsäurederivate mit diazotierten Aminen in Alkalicarbonat oder Bicarbonatlösung erhalten. Ist der Wasserstoff der Hydroxylgruppe durch Radikale verstopft, so bleibt die Diazoreaktion

aus. Vermutlich tritt der Diazokomplex an das oben bezeichnete Kohlenstoffatom und wird diese Reaktion durch die freie Hydroxylgruppe wesentlich beeinflußt (ähnlich wie im Tyrosin das paraständige Hydroxyl auf die Diazoreaktion beeinflussend wirkt).

Kondensiert man die Carboxylgruppe der freien Mekonsäure oder deren Ester mit Hydrazinderivaten,

```
                  OH
                 /
                C===C—COOR
               /     \
R—NH—N=C        O
               \     /
                CH=C—COOR
```

so erhält man stark giftige Substanzen, die in sehr geringen Mengen tödlich wirken.

Von weiterem Interesse war die Wirkung einiger Kondensationsprodukte von Mekonsäure mit Harnstoffderivaten.

Läßt man auf das Silbersalz der Mekonsäure Chlorurethan einwirken

```
      OAg
     /
    C===C—COOAg              OC2H5
   /     \                   /
C=O       O               C=O
   \     /                   \
    CH=C—COOAg                NHCl
Mekonsaures Silber        Chlorurethan
```

so erhält man eine gut krystallisierende Verbindung, die bei 124° schmilzt. Die Konstitution dieses Körpers konnte nicht ermittelt werden. Man könnte annehmen, daß die 3 Silberatome der Mekonsäure durch Urethanradikale ersetzt worden sind. Die Elementaranalyse (N_2-Kjeldahl) stimmt jedoch nicht mit dieser Formel überein; es wurde eine weit höhere Menge Stickstoff gefunden. (Möglicherweise sind die Doppelbindungen noch zur Anlagerung von Urethan verwandt worden.)

Die reine Substanz ist wenig wirksam. 100 mg betäuben einen Frosch schwach. Die narkotische Wirkung des Urethans wird durch den Mekonsäurekomplex erheblich abgeschwächt.

Endlich wurde noch versucht, die Säure mit Harnstoff und Thioharnstoff zu kondensieren; es wäre zu erwarten gewesen, daß durch den Ringschluß die narkotische Wirkung der

Mekonsäure erhöht würde; doch auch hierbei zeigte der Mekonsäurekomplex eine abschwächende Wirkung im Verhältnis zu den ähnlich konstituierten Harnstoffkondensationsprodukten.

Die Kondensation von Harnstoff und Mekonsäure läßt sich mit Phosphorpentachlorid und Phosphoroxychlorid erreichen. Hierbei entsteht eine Verbindung, deren Analyse den Schluß auf folgende Konstitutionsformel zuläßt:

```
         OH
        /
       C═══C—CO—HN
      /     \      |
   C=O       O    C=O
      \     /      |
       CH=C—CO—HN.
```

Dieses ist ein gelbes Pulver, das in Wasser und Alkohol leicht löslich ist.

40 mg dieser Substanz verursachen beim Frosch anfangs Krämpfe, dann Lähmung und fibrilläres Muskelzucken. Nach etwa 5 Stunden ist die Wirkung verschwunden. 70 mg wirken beim Frosch letal (diastolischer Herzstillstand).

Über das Silbersalz lassen sich mit Halogenalkyl die alkylierten Kondensationsprodukte erhalten. Von diesen wurde das Äthyl- und Propylderivat des Mekonylharnstoffs dargestellt. Die Konstitution dieser Verbindungen konnte nicht ermittelt werden. Vermutlich sind die Alkylreste in den Mekonsäurekomplex eingetreten. Der Wasserstoff der Hydroxylgruppe ist nicht substituiert; denn die Substanzen sind in Natronlauge leicht löslich und geben noch Diazoreaktion.

Diese Substanzen sind den entsprechenden Mekonsäureestern in ihrer Wirkung ähnlich. 25 mg rufen beim Frosch nach kurzer Zeit Lähmung und Betäubung hervor, die bei der Propylverbindung 3 Tage lang anhalten; auch öfter sich wiederholende Krämpfe sind zu beobachten. Beim Kaninchen sind 3 g noch vollständig wirkungslos.

Der Mekonylthioharnstoff und seine alkylierten Derivate wurden auf die gleiche Weise dargestellt. Die Elementaranalyse stimmt mit folgender Konstitutionsformel überein:

```
 OH
 /
C====C—CO—HN
/    \      |
C=O   O     C=S
\    /      |
CH=C—CO—HN.
```

In seiner Wirkung steht er dem Harnstoffderivat nach; etwa die 3fache Menge der Substanz ist nötig, um die gleichen Lähmungserscheinungen hervorzurufen. Fibrilläres Muskelzucken wurde nicht beobachtet.

Das Propylderivat des Mekonylthioharnstoffs ruft in einer Menge von 60 mg beim Frosch eine Lähmung und Betäubung hervor, die etwa 20 Stunden anhält.

Beim Kaninchen ist diese wie die vorangehende Substanz unwirksam.

Die Mekonsäure galt im allgemeinen als eine ganz unwirksame Substanz, ihre Bedeutung im Opium wurde lediglich darin gesehen, daß sie ein ausgezeichnetes Mittel darstelle, die verschiedenen Alkaloide in wäßrige Lösung zu bringen, ihre Zweibasischkeit kombiniert mit einem weiteren Hydroxyl von saurem Charakter befähigt sie ganz besonders dazu. Neuerdings sind nun Stimmen laut geworden, daß die Mekonsäure wenigstens insofern eine narkotische Fähigkeit habe, als sie die Wirkung von Morphin unterstütze und vermehre[1]). Wenn wirklich eine solche schlummernde Qualität in der Mekonsäure vorhanden ist, so war anzunehmen, daß sie besonders geweckt werden könnte, wenn man substitutierte Mekonsäuren darstellt nach jenen Gesichtspunkten, die sich bei der Schaffung der modernen Schlafmittel bewährt haben. Auf diese Anregung Prof. Straubs hin ist die vorliegende Arbeit entstanden. Ihr Ergebnis ist ein negatives, keines der erhaltenen Derivate hat eine ausgesprochene narkotische Wirkung. Damit dürfte die Mekonsäure wieder auf ihre alte Rolle des Lösungsmittels zurückverwiesen werden.

---

[1]) Barth, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 1912, 70.

Experimentelles[1]).

Mekonylessigsäureester.

5 g Mekonsäure, die durch mehrstündiges Trocknen bei 120° vollständig wasserfrei gemacht wurde, wurden mit der doppelten Gewichtsmenge frisch destilliertem Acetylchlorid 5 Stunden im Ölbad auf 60° erhitzt. Nach dem Erkalten krystallisiert die Säure aus; diese wurde abfiltriert und nach dem Trocknen auf Ton aus absolutem Alkohol umkrystallisiert.

Weiße Krystallnadeln, in Alkohol, Äther und Essigsäureanhydrid leicht löslich, in Wasser schwer löslich. Durch Alkali wurde die Verbindung zu Mekonsäure und Essigsäure verseift. Ausbeute 3,8 g.

Schmelzpunkt 218°.

Elementaranalyse: 0,2143 g Substanz geben 0,3504 g CO_2, 0,0463 g H_2O = 44,5% C, 2,35% H

0,1978 g Substanz geben 0,3234 g CO_2, 0,0426 g H_2O = 44,5% C, 2,37% H

Theorie: 44,6% C, 2,5% H.

Mekonylbenzoesäureester.

5 g wasserfreie Mekonsäure wurden mit der doppelten Gewichtsmenge Benzoylchlorid 5 Stunden im Ölbad am Rückflußkühler auf 220 g erhitzt. Die Hauptmenge des Benzoylchlorids wurde im Vakuum abdestilliert, worauf im Rückstand die Säure beim Erkalten auskrystallisiert. Nach dem Abpressen auf Ton wurde aus absolutem Alkohol umkrystallisiert und mit Tierkohle entfärbt.

Weiße Krystallblättchen, in Alkohol, Äther und Chloroform löslich, in Wasser schwer löslich. Ausbeute 3 g.

Schmelzpunkt 248° unter Zersetzung und Gasentwicklung.

Elementaranalyse: 0,2050 g Substanz geben 0,4147 g CO_2, 0,0479 g H_2O = 55,1% C, 25% H

0,2001 g Substanz geben 0,4043 g CO_2, 0,0460 g H_2O = 55,0% C, 2,6% H

Theorie: 55,2% C, 2,6% H.

---

[1]) Der Firma C. F. Böhringer & Söhne, Mannheim-Waldhof, bin ich für die Überlassung der benötigten Mekonsäuremengen zu besonderem Dank verpflichtet.

Mekonsäuremonomethylester.

In eine Lösung von 1 Teil wasserfreier Mekonsäure in 2 Teilen entwässertem Methylalkohol wurde unter gleichzeitigem, Kochen am Rückflußkühler so lange trocknes Salzsäuregas eingeleitet, bis aus der Lösung Krystalle sich abschieden. Diese wurden nach dem Absaugen auf Ton abgepreßt und aus Alkohol zweimal umkrystallisiert.

Weiße Krystalle in Alkohol und warmem Wasser löslich. Ausbeute 90 % der Theorie.

Schmelzpunkt: 161,5°.

Elementaranalyse: 0,2193 g Substanz geben 0,3890 g CO_2, 0,0592 g H_2O = 48,3 % C, 3,0 % H

0,2041 g Substanz geben 0,3602 g CO_2, 0,0546 g H_2O = 48,1 % C, 2,8 % H

Theorie: 48,4 % C, 3,03 % H.

Mekonsäuredimethylester.

In eine Lösung von 1 Teil wasserfreier Mekonsäure in 2 Teilen absolutem Methylalkohol wurde unter gleichzeitigem Kochen am Rückflußkühler so lange trocknes Salzsäuregas eingeleitet, bis der anfangs entstandene Niederschlag wieder vollständig in Lösung gegangen war. Nach mehrstündigem Stehen wurde die Lösung in die doppelte Menge Eiswasser gegossen und der ausgeschiedene Krystallbrei nach dem Absaugen auf Ton getrocknet. Die Krystalle wurden aus Alkohol umkrystallisiert und mit Tierkohle entfärbt.

Weiße Krystalle in Alkohol leicht, in Wasser schwer löslich. Ausbeute 85 % der Theorie.

Schmelzpunkt: 117°.

Elementaranalyse: 0,2006 g Substanz geben 0,3479 g CO_2, 0,0631 g H_2O = 47,2 % C, 3,5 % H

0,1998 g Substanz geben 0,3451 g CO_2, 0,0628 g H_2O = 47,1 % C, 3,4 % H

Theorie: 47,3 % C, 3,5 % H.

Mekonsäuremonoäthylester und Mekonsäurediäthylester.

Diese beiden Verbindungen sind bereits früher von E. Mennel[1]) durch Einleiten von Salzsäuregas in die absolut

[1]) Journ. f. prakt. Chem. **26**, 449 f.

alkoholische Lösung von Mekonsäure dargestellt. Ich habe die Verbindungen auch erhalten durch Kochen von Mekonsäure mit Äthylalkohol und konzentrierter Schwefelsäure. Die Schmelzpunkte der verschieden dargestellten Ester waren identisch; auch die übrigen Eigenschaften stimmten mit den von Mennel früher angeführten überein.

Schmelzpunkt des Monoäthylesters: 179°.

Schmelzpunkt des Diäthylesters: 111,5°.

Propyl-, Isobutyl- und Isoamylester der Mekonsäure.

Diese Ester wurden nach den oben beschriebenen Arbeitsmethoden erhalten durch Kochen der wasserfreien Säure mit den entsprechenden Alkoholen unter Zugabe von Kondensmitteln.

Saurer Propylester: weiße Krystalle. Schmelzpunkt: 165°.

Dipropylester: weiße Krystalle. Schmelzpunkt: 105°.

Diisobutylester: weiße Krystalle. Schmelzpunkt: 98°.

Diisoamylester: farblose Flüssigkeit[1]).

Äther der Mekonsäureester.

Der Äthyläther des Mekonsäurediäthylesters ist ebenfalls früher von E. Mennel[2]) dargestellt. Auf gleiche Weise lassen sich die Homologen erhalten. Die entsprechenden Ester wurden durch Silbernitrat in die Silbersalze übergeführt und diese durch Kochen mit Jodäthyl in die Äther verwandelt.

Chlorurethan.

7 g Urethan wurden in 50 ccm Wasser gelöst und mit 10 g feingepulvertem Zinkoxyd versetzt. In die mit Eis gekühlte Suspension wurde ein rascher Chlorstrom eingeleitet. Hierbei löst sich das Zinkoxyd auf, und das Chlorurethan scheidet sich allmählich als gelbes Öl ab. Dieses wurde im Scheidetrichter von der wäßrigen Zinklösung getrennt und nach dem Trocknen mit Natriumsulfat durch wiederholtes Rektifizieren gereinigt. Ausbeute quantitativ.

---

[1]) Bemerkenswert ist die Abnahme des F. mit steigendem Molekulargewicht.

[2]) Journ. f. prakt. Chem. 26, 455.

Grüngelbes Öl; Siedepunkt 27° bei 20 mm B.

Elementaranalyse: 0,2 g Substanz geben 0,2332 g AgCl = 28,2 % Cl

0,2 g Substanz geben 0,2335 g AgCl = 28,5 % Cl

Theorie: 28,4 %.

Mekonsäureurethanverbindung.

In die wäßrige Lösung von 1 Molekül Mekonsäure wurde eine konzentrierte Lösung von 3 Molekülen Silbernitrat eingetragen; hierbei scheidet sich das Silbersalz als unlösliches gelbes Pulver ab. Dieses wurde unter Lichtabschluß abgesaugt und über Schwefelsäure getrocknet. Das feingepulverte Silbersalz wurde hierauf in absolutem Äther suspendiert und unter Umschütteln allmählich mit der dreifach molekularen Menge Chlorurethan versetzt. Nach starker Wärmeentwicklung geht hierbei die Mekonsäureurethanverbindung rasch in die ätherische Lösung und kann durch Verdampfen des Äthers in fast quantitativer Ausbeute erhalten werden. Durch Umkrystallisieren aus Äther wurde das reine Produkt erhalten.

Weiße Krystallnadeln; Schmelzpunkt 124°; leicht löslich in Äther und Alkohol; wenig löslich in heißem Wasser.

Elementaranalyse: Stickstoff (Kjeldahl) 0,2 g Substanz verbrauchen 21,1 ccm $^n/_{10}$-Säure = 14,7 % N_2,

0,2 g Substanz verbrauchen 21,2 ccm $^n/_{10}$-Säure = 14,7 % N_2.

Mekonylharnstoff.

5 g wasserfreie Mekonsäure wurden mit 4 g feingepulvertem trocknen Harnstoff in 80 ccm wasserfreiem Chloroform suspendiert. Nach Zusatz von 2 g Phosphorpentachlorid und 3 ccm Phosphoroxychlorid wurde das Gemisch 2 Stunden auf dem Wasserbad am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt; unter Entwicklung von Salzsäure geht die Reaktion allmählich vor sich, wobei sich der Mekonylharnstoff als gelbe krümelige Masse abscheidet. Diese wurde abfiltriert und aus verdünntem Alkohol wiederholt umkrystallisiert.

Gelbes Pulver, leicht löslich in Wasser und Alkohol, unlöslich in Äther und Chloroform. Ausbeute 7 g. Schmelzpunkt: 173° unter Zersetzung.

Elementaranalyse:

Stickstoff (Kjeldahl) 0,2 g Substanz verbrauchen 17,6 ccm $^{n}/_{10}$-Säure = 12,30 % N_2; 0,2 g Substanz verbrauchen 17,5 ccm $^{n}/_{10}$-Säure = 12,15 % N_2.

Theorie 12,40 % N_2.

Äthylmekonylharnstoff.

5 g Mekonylharnstoff wurden in heißem Wasser gelöst und mit einer Lösung von 5 g Silbernitrat in 20 ccm Wasser unter Umrühren versetzt. Hierbei fällt das Silbersalz als gelber Niederschlag aus. Dieses wurde nach dem Erkalten der Lösung unter Lichtabschluß abgesaugt, mit Wasser gewaschen und auf Ton getrocknet.

5 g des wasserfreien, feingepulverten Silbermekonylharnstoffs wurden am Rückflußkühler auf dem Wasserbade mit 10 ccm Jodäthyl 3 Stunden gekocht. Nach dem Abdestillieren des Jodäthyls wurde das Reaktionsprodukt mit Alkohol öfters ausgekocht. Aus den vereinigten alkoholischen Extrakten krystallisierte beim Eindampfen Äthylmekonylharnstoff aus. Dieser wurde mit Tierkohle entfärbt und aus Alkohol wiederholt umkrystallisiert. Ausbeute 3,5 g.

Weißes Krystallmehl; leicht löslich in Alkohol, schwer löslich in heißem Wasser und in Äther. Schmelzpunkt: 138° unter Zersetzung.

Elementaranalyse: Stickstoff (Kjeldahl) 0,2 g Substanz verbrauchen 15,8 ccm $^{n}/_{10}$-Säure = 11,06 % N_2;

0,2 g Substanz verbrauchen 15,8 ccm $^{n}/_{10}$-Säure = 11,1 % N_2;

Theorie: 11,1 % N.

Propyl- und Allylmekonylharnstoff.

Auf die gleiche Weise wie Äthylmekonylharnstoff wurden aus dem Silbersalz des Mekonylharnstoffs und den entsprechenden Jodalkylen der Propyl- und Allylmekonylharnstoff erhalten.

Propylmekonylharnstoff: weißes Krystallpulver, schwer löslich in heißem Wasser und Äther, leicht löslich in Alkohol. Schmelzpunkt: 141° unter Zersetzung.

Allylmekonylharnstoff: weißes Krystallpulver, schwer löslich in heißem Wasser und Äther, leicht löslich in Alkohol. Schmelzpunkt: 143° unter Zersetzung.

Mekonylthioharnstoff.

5 g wasserfreie Mekonsäure wurden mit 4 g feingepulvertem trocknen Thioharnstoff in 80 ccm wasserfreiem Chloroform suspendiert. Nach Zusatz von 2 g Phosphorpentachlorid und 3 ccm Phosphoroxychlorid wurde das Gemisch 2 Stunden auf dem Wasserbad am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt; unter Entwicklung von Salzsäuregas vollzieht sich die Reaktion, und das Kondensationsprodukt scheidet sich als graues Pulver ab. Nach dem Erkalten wurde der Mekonylthioharnstoff abgesaugt und aus Alkohol wiederholt umkrystallisiert.

Hellgelbes Krystallpulver, leicht löslich in Alkohol und Wasser, schwer löslich in Äther. Ausbeute 6 g. Schmelzpunkt: 181° unter Zersetzung.

Elementaranalyse: Stickstoff (Kjeldahl) 0,2 g Substanz verbrauchen 16,5 ccm $^{n}/_{10}$-Säure = 11,5 % N_2;

0,2 g Substanz verbrauchen 16,7 ccm $^{n}/_{10}$-Säure = 11,6 % N_2;

Theorie: 11,7 % N.

Propylmekonylthioharnstoff.

5 g Mekonylthioharnstoff wurde in 200 ccm heißem Wasser gelöst und unter Umrühren mit einer Lösung von 5 g Silbernitrat in 20 ccm Wasser versetzt. Hierbei scheidet sich das Silbersalz als gelbes Krystallpulver ab. Dieses wurde ausgewaschen, unter Lichtabschluß abgesaugt und auf Ton getrocknet.

5 g des trocknen feingepulverten Silbermekonylthioharnstoffs wurden mit 10 ccm Jodpropyl im Ölbad auf 110° am Rückflußkühler 3 Stunden erhitzt. Das überschüssige Jodpropyl wurde hierauf abdestilliert und das Reaktionsprodukt öfters mit Alkohol ausgekocht. Aus den vereinigten alkoholischen Auszügen krystallisiert der Propylmekonylharnstoff beim Eindampfen aus. Er wurde schließlich mit Tierkohle entfärbt und aus Alkohol wiederholt umkrystallisiert.

Weißes Krystallmehl, leicht löslich in Alkohol, sehr schwer löslich in Wasser und Äther. Schmelzpunkt: 138° unter Zersetzung.

Elementaranalyse: Stickstoff (Kjeldahl) 0,2 g Substanz verbrauchen 14,1 ccm $^{n}/_{10}$-Säure = 9,8 % N_2;

0,2 g Substanz verbrauchen 14,2 ccm $^{n}/_{10}$-Säure = 9,8 % N_2:

Theorie: 9,9 % N.

Über die Volumänderungen menschlicher Erythrocyten in hypertonischen Kochsalzlösungen.

Von

Julius Bauer.

(Aus der medizinischen Abteilung der Allgemeinen Poliklinik in Wien.)

(Eingegangen am 10. Mai 1919.)

Die Veranlassung zu den vorliegenden Untersuchungen gab die Fragestellung, ob es möglich sei, das Alter der einzelnen im Blute zirkulierenden Erythrocyten festzustellen, bzw. ob sich verschieden lange im Kreislauf befindliche, morphologisch gleich beschaffene rote Blutkörperchen biologisch differenzieren lassen. Da sich junge Erythrocyten von alten unter anderem wahrscheinlich durch ihren verschiedenen relativen H_2O-Gehalt unterscheiden dürften, so lag es nahe, den Schrumpfungsgrad in hypertonischen Salzlösungen, der ja vom H_2O-Gehalt abhängig ist, als Erkennungsmittel zu verwenden. Wie ich gleich von vornherein feststellen will, hat dieser Weg nicht zu dem erwünschten Ziele geführt, das vielmehr auf andere Weise erreicht wurde (vgl. J. Bauer und B. Aschner). Tatsächlich sind ja auch über den H_2O-Gehalt verschieden alter Erythrocyten die Meinungen geteilt. Ubbels z. B. hält fötale Blutkörperchen für wasserärmer und stromareicher, Handovsky schließt dagegen aus seinen Versuchen auf einen höheren Quellungsgrad der jungen Formen. Als Nebenbefund dieser Untersuchungen hat sich aber eine Tatsache herausgestellt, die mir immerhin einiges biologische Interesse zu beanspruchen scheint.

Die Methode, deren ich mich bediente, war folgende: In eigens zu diesem Zwecke angefertigte, $2^1/_2$ ccm fassende kleine Zentrifugierröhrchen mit genauer Graduierung wurden je 1 ccm

der betreffenden Salzlösung und 1 ccm der Erythrocytenaufschwemmung in 0,9 % NaCl gebracht. Nach längerem scharfen Zentrifugieren wurde der Stand der Erythrocytensäule mit der Lupe abgelesen. Das abgelesene Volumen wurde in Prozente desjenigen Erythrocytenvolumens umgerechnet, das die roten Blutkörperchen in isotonischer, also 0,9 %iger NaCl-Lösung in der gleichen Zeit gezeigt hatten. Durch längeres Zentrifugieren wurden auf diese Weise mehrere, nicht sehr differente Werte gewonnen, deren Durchschnitt als die zahlenmäßige Volumänderung, Schrumpfung bzw. Quellung angesehen wurde. Das Zentrifugieren bis zur Volumkonstanz hält zwar Hamburger nicht für notwendig, doch suchte ich der Volumkonstanz wenigstens möglichst nahe zu kommen, um Täuschungen durch die verschiedene Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten zu vermeiden. Bis zum Lackfarbigwerden des Blutes zu zentrifugieren, wie es Koeppe fordert, um die Möglichkeit einer zwischen den roten Blutkörperchen zurückbleibenden Flüssigkeitsschichte ausschließen zu können, habe ich nur ausnahmsweise versucht.

Bei derartigen Versuchen zeigte es sich nun, daß menschliche Erythrocyten in höher konzentrierten NaCl-Lösungen als 0,9 % durchaus nicht immer ein kleineres Volumen annehmen und daß vor allem ungewaschene menschliche Erythrocyten in 1,0 %iger NaCl-Lösung regelmäßig ein etwas größeres Volumen haben als in 0,95 %iger. Dieses Ergebnis war mir anfangs so befremdend, daß ich die stärksten Zweifel in die Versuchsanordnung setzte, an eine Verwechslung der Lösungen dachte und die verwendeten Salzlösungen selbst durch Titration des NaCl-Gehaltes kontrollierte. Die folgenden Beispiele mögen als Belege angeführt sein.

Eine nähere Erörterung dieser Tabelle erscheint überflüssig. Wir können uns auf einige kurze Bemerkungen beschränken. Daß eine eventuelle verschiedene Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten, die zweifellos bei derartigen Versuchen berücksichtigt werden muß, Volumdifferenzen vortäuschen kann, die in Wirklichkeit nicht bestehen, zeigt Versuch 5 in klarer Weise; er zeigt aber auch, daß die Volumzunahme in 1,0 %iger NaCl-Lösung gegenüber der 0,95 %igen

Tabelle.

Fall	Erythrocyten	Volum in x %iger NaCl-Lösung (in Prozenten des Volums in 0,9 %iger NaCl-Lösung)			Bemerkungen
		NaCl 0,95 % %	NaCl 1,0 % %	NaCl 1,1 % %	
1. Dermer, F., 55 J. ♀. Carcin. mammae	gewaschen	106,4	102,3	93,6	
	ungewaschen	95,8	100,6	92,3	
2. Petrik, J., 28 J. ♂. Icter. catarrh.	gewaschen	101,1	97,1	90,0	
	ungewaschen	96,7	101,4	94,2	
		NaCl 0,95 % %	NaCl 1,0 % %	NaCl 1,2 % %	
3. Pankow, 30 J. ♂. Gesund	ungewaschen	92,8	93,1	86,6	
4. Gartner, 25 J. ♂. Gesund	ungewaschen	95,1	96,7	88,2	
		NaCl 0,95 % %	NaCl 1,0 % %	NaCl 0,85 % %	
5. Kuczowicz, 26 J. ♂. Erschöpfung	ungewaschen	99,8	101,6	103,1	Versuch vom 14. VIII. 1918
		NaCl 0,95 % %	NaCl 1,0 % %	Das eigene Serum %	
					Versuch vom 20. VIII. 1918.
		99,0	101,2	94,9	Nach relativ kurzem Zentrifugieren (Mittelwert)
		98,2	100,3	99,9	Nach langem Zentrifugieren bis zu kaum merkbaren weiteren Volumänderungen

nicht auf einer derartigen Täuschung beruhen kann. Wir sehen nämlich, daß nach relativ kurzem Zentrifugieren das Volumen der Erythrocyten in dem Serum desselben Individuums erheblich kleiner erscheint als in 0,9 %iger NaCl-Lösung, daß sich aber dieser Unterschied bei entsprechend langem, bis nahe an die Volumkonstanz fortgesetztem Zentrifugieren ausgleicht, d. h. die Erythrocyten senken sich im Serum rascher als in physiologischer NaCl-Lösung, eine Beobachtung, die schon Berczeller und Stanker gemacht haben. Die Volumdifferenz zwischen der 0,95 %igen und 1,0 %igen NaCl-Lösung ist dagegen während der ganzen Zeit des Zentrifugierens unverändert geblieben, eine Verschiedenheit der Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten in den beiden NaCl-Lösungen kann also für diese Differenz nicht verantwortlich gemacht werden. Tat-

sächlich entspricht auch in unserem Versuche nach genügend langem Zentrifugieren das Erythrocytenvolumen im Serum demjenigen in 0,9 %iger NaCl-Lösung. A priori muß man es ja schon für höchst unwahrscheinlich halten, daß Verschiedenheiten der Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten die beschriebene Volumdifferenz vortäuschen. Es wäre ganz und gar unverständlich, warum die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten, wenn sie schon von der Konzentration des Suspensionsmittels abhängig ist, dieser Konzentration nicht proportionale, diskontinuierliche Veränderungen zeigen sollte.

Einen Einfluß bestimmter Erkrankungen auf die beschriebenen Erscheinungen habe ich bisher nicht feststellen können, wiewohl die individuellen Unterschiede bezüglich der Volumänderungen in leicht hypertonischen Salzlösungen nicht unbeträchtlich sind. Vielleicht könnte hier an kleine Differenzen des osmotischen Drucks im Serum gedacht werden, wie sie Hamburger nicht nur für einzelne Tierspezies, sondern auch für verschiedene Individuen der gleichen Spezies gefunden hat. Bei Versuchen, die sich rasch senkenden Erythrocyten und die schwer zentrifugierbaren Blutkörperchen gesondert in der gleichen Weise zu prüfen, habe ich vorläufig keine eindeutigen Ergebnisse gewonnen. Die Konzentration der verwendeten Erythrocytenaufschwemmung ist für die beschriebenen Volumänderungen ohne Belang. Das Blut wurde aus der Vena mediana cubiti direkt in einer Lösung von

K oxalic. . . .	0,28
NaCl	0,8
H_2O	100,0

aufgefangen.

Das Waschen der Erythrocyten geschah, wie allgemein üblich, durch dreimaliges Aufschwemmen in 0,9 %iger NaCl-Lösung, Abzentrifugieren und Abpipettieren der Waschflüssigkeit. Warum die charakteristische Volumdifferenz in 0,95 %iger und 1,0 %iger NaCl-Lösung nur bei ungewaschenen Erythrocyten zu beobachten ist, können wir vorderhand nicht näher erklären. Jedenfalls spielen die beim Waschen vor sich gehenden osmotischen Vorgänge eine Rolle.

Eine Deutung der beschriebenen Volumänderungen läßt sich nur vermutungsweise geben. Für das Volumen der Blut-

körperchen sind, wie wir seit den Untersuchungen Hedins und Hamburgers wissen, nicht bloß die Gesetze der Osmose maßgebend, es kommen dabei auch spezifische Ionenwirkungen in Betracht. Hedin konnte zeigen, daß Erythrocyten in isosmotischen Salzlösungen nur dann ein gleiches Volumen zeigen, wenn die Salzlösungen mit dem Blutserum isotonisch sind. Waren die Salzlösungen, obgleich untereinander isosmotisch, gegenüber dem Blutserum hyper- oder hypisotonisch, so waren die Blutkörpervolumina ungleich. Hamburger kommt in Verfolgung dieser Untersuchungen zu folgendem Ergebnis: „Wenn es nun feststeht, daß in jeder Salzlösung, die mit dem entsprechenden Serum isotonisch ist, das Volumen der Blutkörperchen unverändert bleibt, so ist damit noch nicht gesagt, daß diese Unveränderlichkeit sich auch auf Form und chemische Zusammensetzung erstreckt. In der Tat stellt sich heraus, daß die bikonkaven Scheibchen des Säugetierblutes in jeder fremden Flüssigkeit, sogar in Lymphe, ihre ursprüngliche Gestalt verlieren und unter Verkleinerung des großen Durchmessers der Kugelform zustreben."

Wir könnten uns also, wie ich glaube, vorstellen, daß derartige Formveränderungen der Erythrocyten in verschieden konzentrierten Salzlösungen (vgl. Weidenreich) zu den Volumdifferenzen Veranlassung geben, indem etwa noch mehr oder minder kleine Mengen von Flüssigkeit zwischen den einzelnen Blutkörperchen auch bei langem Zentrifugieren zurückbleiben. Nach Koeppe soll allerdings trotz ungleicher Form das Volumen der Erythrocyten unverändert bleiben.

Die gleiche Irregularität der Volumänderung der roten Blutkörperchen in anisotonischen Salzlösungen scheint übrigens auch bei anderen Konzentrationen vorzukommen. So fanden Stassano und Billon, daß namentlich bei Vögeln das Erythrocytenvolumen von der NaCl-Konzentration 0,75 % aufwärts — die Autoren hielten damals diese Salzkonzentration für die dem Serum isotonische — nicht kontinuierlich abnimmt, sondern zuerst etwas ansteigt, um dann erst wieder abzusinken. Bei Kaninchen sahen sie diesen irregulären Volumanstieg nur zwischen 0,74375 und 0,75 % NaCl. Im übrigen ist auch aus der beigegebenen Kurve von Stassano und Billon ersichtlich, daß das Erythrocytenvolumen in 0,9 % NaCl identisch ist mit dem

im eigenen Blutplasma. Eine Erklärung für ihren Befund haben die französischen Autoren nicht gegeben.

Ob diesen Dingen irgendeine klinische Bedeutung einmal zukommen könnte, ist schwer zu sagen. Es sei aber jedenfalls an eine Bemerkung von Porges und Strisower erinnert, die in einem Falle von Marschhämoglobinurie im Anfall eine Schrumpfung der Erythrocyten in Hayemscher Lösung beobachteten.

Literatur.

Bauer, J., und B. Aschner, Arch. f. klin. Med. **1919**. (Im Druck.)

Berczeller, L., und E. Stanker, Internat. Zeitschr. f. physikal.-chem. Biol. **3**, 2. Heft, 133, 1917.

Hamburger, H. J., Osmot. Druck und Ionenlehre in den med. Wissenschaft. Wiesbaden **1**, 1902.

Handovsky, H., Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **69**, 412, 1912.

Hedin, S., zit. nach Hamburger.

Koeppe, H., Arch. f. d. ges. Physiol. **107**, 187, 1905.

Porges, O., und R. Strisower, Arch. f. klin. Med. **117**, 17.

Stassano, H., und F. Billon, Compt. rend. Soc. Biol. **54**, 288, 1902.

Ubbels, zit. nach Hamburger.

Weidenreich, F., Ergebn. d. Anat. u. Entwicklungsgesch. **13**, 1903.

Zur Methodik der chemischen Blutanalyse. II.

Vergleich zwischen Makro und Mikroverfahren.

Von

M. Richter-Quittner.

(Aus dem Chemischen Laboratorium Kaiserin-Elisabeth-Spital in Wien. [Vorstand: Prof. Dr. W. Falta.])

(Eingegangen am 13. Mai 1919.)

Bis vor kurzem haben alle Chemiker an dem Grundsatz der analytischen Chemie festgehalten, durch Verwendung eines möglichst großen Ausgangsmaterials die Analysenfehler möglichst herabzudrücken. Durch diese Forderung aber können aus technischen Gründen viele Probleme der organischen Chemie, besonders aber der Biochemie und Stoffwechselchemie, bei der uns nur wenig Material zur Verfügung steht, keiner Lösung zugeführt werden. Es geht daher das Bestreben aller Analytiker dahin, die bei den Makroanalysen geforderte Genauigkeit auch bei Mikroanalysen zu erreichen. Die Versuche sehr vieler Autoren, sich diesem Ziel dadurch zu nähern, daß sie bei gleichbleibender Methodik einfach weniger Ausgangsmaterial verwendeten, schlugen aber aus begreiflichen Gründen vollkommen fehl. Leider finden solche „Mikromethoden" in der Blutanalytik immer noch sehr große Anwendung. Ich habe auf diesen Punkt in meiner ersten Mitteilung Bezug genommen.

Durch die genialen Methoden von Pregl, Emich und Donau, die vielfach die Makromethoden an Genauigkeit übertreffen, sind heute viele Analysen der Mikrochemie zugänglich gemacht worden. In dieser Hinsicht ist die Biochemie auch Ivar Bang zu großem Dank verpflichtet, der eine Reihe von Präzisionsverfahren für titrimetrische Bestimmungen ausge-

arbeitet hat, die an Zuverlässigkeit von keiner anderen Methode erreicht werden. Pregl hat, wie bekannt, seine Mikroverfahren für organische Elementaranalysen angegeben, doch sind in den letzten Jahren die Prinzipien dieser Methoden auch in der Technik und Biochemie mit großem Erfolg angewendet worden. Ich erinnere an die elektrolytische Kupferbestimmung in Gemüsekonserven, an die Mikroanalysen des Weines von Dr. Ripper, an die N-Bestimmung usw. Nichtsdestoweniger glaube ich, daß sich die auf dem Gebiet der organischen Chemie gemachten Erfahrungen nicht so ohne weiteres auf die Blutanalytik übertragen lassen. Das Blut ist ein flüssiges Gewebe! Es ist wohl als feststehend zu betrachten, daß es kein tierisches Gewebe gibt, das in allen seinen Teilen vollkommen homogen ist, wenn auch nicht immer in morphologischer Beziehung, so doch in seiner chemischen Zusammensetzung. Das Blut ist eine kolloidale Lösung, und es ist lange bekannt, daß bei kolloidal gelösten Stoffen im Unterschied zu ionisierten Lösungen krystalloider Substanzen ein Tropfen einer solchen Lösung nicht vollkommen identisch mit einem zweiten sein kann. Aus rein theoretischen Überlegungen halte ich das Bangsche Mikroverfahren, bei dem für eine Bestimmung nicht mehr als 1 bis 3 Tropfen Blut in Verwendung kommen, nicht für zweckmäßig. Ich halte bei Mikromethoden 2 bis 3 ccm Blut für das äußerste Minimum.

Eine richtige Mikroanalyse muß folgenden Anforderungen genügen:

1. Muß man über genaue Meßinstrumente und Apparate verfügen. Gravimetrische Bestimmnngen lassen sich nur mit Hilfe einer Kuhlmannschen Mikrowage, nicht aber mit der so viel verwendeten Torsionswage von Hartmann und Braun ausführen.

2. Muß auf die Herstellung der für die Titrationen erforderlichen Lösungen größte Sorgfalt verwendet werden. In dieser Richtung leisten die Vorschriften von Bang ausgezeichnete Dienste.

3. Muß man sich von der chemischen Reinheit der zu verwendenden Chemikalien überzeugen. Es sind daher bei jeder Bestimmung Blindversuche unerläßlich.

4. Ist bei allen Mikroanalysen große Übung und Geduld selbstverständliche Voraussetzung.

5. Ist auch die ganze Anlage des Laboratoriums durchaus nicht gleichgültig. Mikrobestimmungen lassen sich nur in einem hellen trocknen Raum, der vollkommen frei von Säuren und Ammoniakdämpfen ist, Mikrotitrationen nur bei natürlichem Licht ausführen.

Bei Beachtung dieser Vorschriften können mikroanalytisch sehr schöne Resultate erzielt werden. Dem Mikroverfahren ist auf allen Gebieten der Chemie eine große Zukunft sicher, bedeuten doch die Mikroanalysen auch bei reichlich vorhandenem Ausgangsmaterial eine große Ersparnis an Zeit und Chemikalien.

In der Blutanalytik stehen sich heute zwei Ansichten ziemlich schroff gegenüber. Während viele Forscher — hauptsächlich Chemiker — immer noch an den Makroanalysen festhalten, werden von Ärzten vielfach die Bangschen Mikroverfahren verwendet. Ich möchte mir hier den Vorschlag erlauben, zwischen dem Zuviel und dem Zuwenig den goldenen Mittelweg einzuschlagen und unter Verwendung einiger Kubikzentimeter statt einiger Tropfen Blut die erprobten Mikromethoden zu verwenden.

Die Bangschen Originalmethoden (Bestimmung von Chloriden, Rest-N, Harnstoff, Zucker, Fett und Trockenmasse) schließen meiner Ansicht nach folgende Fehlerquellen ein:

1. Halte ich aus den bereits erwähnten Gründen Analysen, die nur in 1 bis 2 Tropfen Blut ausgeführt wurden, für unsicher und verwende daher ca. 3 ccm.

2. Lassen sich meiner Ansicht nach bei der Manipulation der Filterwägung Fehler nicht vermeiden, da das trockne Papier, wie man sich leicht überzeugen kann, bei der Wägung Feuchtigkeit aus der Luft aufnehmen kann und das mit Blut getränkte Papier Wasser durch Verdunstung abgeben kann.

3. Halte ich das Enteiweißungsverfahren mit Hilfe der Filter (das Eiweiß soll am Filter haften bleiben) für sehr unsicher und ziehe es vor, 3 ccm Blut oder Plasma nach einer entsprechenden Methode zu enteiweißen und die enteiweißten Filtrate weiter nach Bang zu behandeln.

4. Wäre an Stelle der Torsionswage unbedingt einer Kuhlmannschen Wage der Vorzug zu geben.

5. Lassen sich gegen die Bangsche Methode auch biologische Einwände machen (Bang führt seine Bestimmungen im Capillarblut aus), auf die wir an anderer Stelle eingehen wollen. Der große Vorzug der Bangschen Methoden liegt darin, daß Bang die wenigen Tropfen Blut, die er für eine Bestimmung braucht, aus der Fingerbeere nehmen kann, während man, um sich eine größere Blutmenge zu verschaffen, eine Venae punctio machen muß.

In der analytischen Chemie finden heute folgende Mikroverfahren Anwendung:

1. Gravimetrische Methoden,
2. Maßanalytische Methoden,
3. Kolorimetrische Methoden.

Ich werde mich hier ausschließlich mit maßanalytischen Methoden befassen.

1. Blutzuckerbestimmungen.

Um die Filterwägung, das Aufsaugen des Blutes usw. zu vermeiden, habe ich die Bangsche Methode in der Weise modifiziert, daß ich mit Ferrum oxydatum dialysatum Merck enteiweiße und im Filtrat den Zucker nach Bang titriere. Nachträglich habe ich die Bemerkung gemacht, daß schon 1915 R. G. Pearce den Vorschlag gemacht hat, die Bangsche Zuckerbestimmung in dieser Weise abzuändern. Pearce hat damals mit den älteren Bangschen Verfahren gearbeitet und konnte auch auf diesem Wege keine guten Resultate erhalten. In seiner vor wenigen Monaten in dieser Zeitschrift erschienenen Mitteilung macht Bang selbst auf einige Fehlerquellen seiner Methode aufmerksam. Durch Einführung der Jodatmethode und des indirekten Erhitzens ist das Verfahren einfach und genau geworden. Der große Vorteil gegenüber dem früheren Verfahren liegt darin, daß die Oxydation des Kupferoxyduls nun so schnell von statten geht, daß jegliche Luftoxydation vermieden wird. Ferner bewirkt der Zusatz von H_2SO_4 eine reichliche CO_2-Entwicklung. Die modifizierte Zuckerbestimmung gestaltet sich nun folgendermaßen:

a) Gesamtblut. Das Blut wird in einer Vorlage mit Hirudin oder Na oxal. in Substanz (1 g auf 100 ccm Blut) aufgefangen; davon werden 3 ccm abpipettiert.

b) Plasma. 12 ccm Blut, die mit Hirudin (das Hirudin verdanken wir der Firma E. Sachsse & Co. in Leipzig) ungerinnbar gemacht wurden, werden möglichst schnell zentrifugiert und je 3 ccm Plasma zur weiteren Bestimmung verwendet. 3 ccm Plasma werden im 100 ccm-Meßkolben mit 20 ccm einer 10%igen Lösung von Ferrum oxydatum dialysatum Merck und 5 ccm einer 10%igen MgSO-Lösung versetzt. Man

Tabelle I.

Zuckerbestimmung im Harn des Normalen bei gemischter Kost.

Datum	Harnmenge	Spez. Gewicht	Makro-Methode D. nach Bertrand mg absolut	Mikro-Methode D. nach modif. Bang mg absolut
11./12. II. 19	1140	1011	907,30	908,20
14./15. II.	920	1015	840,75	840,86
18./19. II.	950	1015	925,61	925,74
19./20. II.	1040	1014	990,60	990,56
20./21. II.	1090	1015	790,68	791,04
21./22. II.	970	1016	930,68	930,72

Tabelle II.

Zuckerbestimmungen im Plasma bei verschiedenen Erkrankungen (auf 100 ccm berechnet).

Datum	Name	Diagnose	Makro-Methode D. nach Bertrand mg	Mikro-Methode D. nach mod. Bang mg	Bang
17.I.19	Ignatz Milt.	Multiple			144,67
		Sklerose	140,18	140,22	145,28
					143,18
20. I.	Johann V.	Aortitis	120,64	120,70	
24. I.	Joseph Sch.	Nephritis			
		chronica	180,44	180,49	
26. I.	Trg.	Normal	132,02	132,57	
28. I.	Kne.	Erythämie	142,66	142,29	
6. II.	Beer	Diabetes			197,21
		mellitus	195,40	196,00	193,54
					196,82
3. III.	Johanna	Diabetes			
	Schn.	mellitus	170,92	170,99	
					133,98
24. III.	Franz H.	Normal	132,34	132,36	134,62
					131,79
					135,24
8. IV.	Johanna Fr.	Nephritis	147,44	149,05	
4. IV.	Anna Gaist	Pneumonie	150,72	150,89	

Tabelle III.

Bestimmung von Zucker und Chloriden in serösen Körperflüssigkeiten (auf 100 ccm berechnet).

Datum	Bezeichnung	Diagnose	D.		Chloride	
			Makro-Methode Bertrand	Mikro-Methode Bang	Makro-Methode Oppler	Mikro-Method. Bang
13. XII. 18	Ascites				510,9	
5. II. 19	do.	Insuff. mitral.	52,75	52,73		
18. II.	Exsudat	Pleuritis	60,72	60,54	429,0	429,4
20. II.	Ödemflüssigkeit	Myodeg cord.	13,99	13,97	627,4	627,5
21. II.	Exsudat	Pleuritis	40,74	41,02	420,0	421,4
5. III.	Ascites	Myodeg. cord.	49,72	49,60	459,8	459,2

schüttelt gut durch, läßt 15 Minuten absetzen und filtriert durch ein trocknes Filter in ein trockenes Becherglas. 50 ccm des Filtrates werden am Wasserbade bis auf ein Volumen von ca. 5 ccm eingedampft und quantitativ in ein 50 ccm-Jenenser Kochkölbchen übergespült. Man setzt 3 ccm der Kupferstammlösung (0,3567 g KJO_3 + 10 ccm 20% H_2SO_4, 2,50 g $CuSO_4$ im Liter) zu und erhitzt vorsichtig, zweckmäßig mit einer als Gasregulator eingeschalteten Manometerflasche zum Sieden. Man kocht nicht länger als genau 2 Minuten und kühlt schnell unter der Wasserleitung ab. Man titriert mit $^n/_{100}$-Thiosulfat und einigen Tropfen Stärkelösung als Indicator von blau auf farblos.

Wie die Tabellen I, II und III zeigen, habe ich mit dieser Methode sehr gute Resultate erhalten, während die Originalmethode von Bang teils zu hohe, teils zu niedrige Werte ergibt und die Kontrollanalysen oft nicht unbeträchtliche Differenzen zeigen. Wie schon erwähnt, führe ich diese Mißerfolge auf die Wägung und Enteiweißung zurück. Ich muß mich wohl hier, wie bei den übrigen Bangschen Methoden, auf den Einwand gefaßt machen, daß nicht objektive, sondern subjektive Fehler vorliegen. Ich kann zu meiner Rechtfertigung nur die eingangs erwähnten theoretischen Erwägungen geltend machen.

2. Chloridbestimmung.

Nach meinen Erfahrungen ist die Bangsche Filterenteiweißung für die Chloridbestimmung ungeeignet. Man erhält bei der Titration zu hohe Werte, da das Eiweiß einen Teil des $AgNO_3$ bindet. Ich bestimme die freien Chloride mikroana-

lytisch nach folgendem Verfahren, das der in der ersten Mitteilung angegebenen Methode nachgebildet ist.

2 ccm Gesamtblut oder 2 ccm Plasma werden im 100 ccm-Meßkolben mit 2 g festem, chemisch reinem $MgSO_4$ versetzt. Man füllt bis zur Marke mit Methylalkohol auf und schüttelt gut durch. Nach einigen Minuten hat sich der Eiweißniederschlag vollkommen klar abgesetzt. Man filtriert durch ein trocknes Filter und titriert 50 ccm des Filtrates mit 2 Tropfen 10%iger neutraler Kaliumchromatlösung mit $^n/_{100}$-$AgNO_3$ von gelb auf braun.

An Stelle des Methylalkohols kann man auch 90%igen Äthylalkohol verwenden; doch ist in beiden Fällen der Zusatz eines Elektrolyten unbedingt notwendig. Bang hat bereits darauf aufmerksam gemacht, daß die Mohrsche Titration in alkoholischer Lösung genauer ist als in wäßriger, weil die braune Farbe schärfer gegen die gelbe kontrastiert als bei der ursprünglichen Titration. Die Genauigkeit ist ± 0,01 mg. Die Beleganalysen befinden sich in Tabellen IV und V.

Tabelle IV.

Bestimmung von Zucker, Rest-N und „freien" Chloriden im tierischen Plasma (auf 100 ccm berechnet).

Datum	Bezeichnung	Zuckerbestimmung		Rest-N-Bestimmung				Chloridbestimmung		
		Bertrand Makro	Mod. Bang Mikro	Essigsäure Makro	Dialyse Mikro	Mod. Bang Mikro	Bang Mikro	Mod. Folin Makro	Mod. Folin Mikro	Bang Mikro
20. IV. 19	Pferdeplasma	140,79	140,38	70,29	70,00	72,09	89,24 71,39 82,68	674,2	674,9	
27. IV.	Hundeplasma	114,21	114,29	45,62	44,76			699,9	699,0	722,4 700,0

Tabelle V.

Bestimmung der Chloride nach verschiedenen Methoden in einer Eiweißkochsalzlösung (0,3972% NaCl).

Autor	Angewandte Menge	Methodik	Chloride g%
Oppler	20 ccm	Enteiweißung m. Metaphosphorsäure, Titration m. $^n/_{10}$-$AgNO_3$	0,3970
Mod. Folin	10 „	Enteiweißung m. Methylalkohol, Titration m. $^n/_{10}$-$AgNO_3$	0,3969
Mod. Folin	2 „	Enteiweißung m. Methylalkohol, Titration m. $^n/_{100}$-$AgNO_3$	0,3969
Bang	2,46 mg 3,09 „	Filterenteiweißung, Titration m. $^n/_{10}$-$AgNO_3$	0,4162 0,3072

3. Rest-N-Bestimmung.

Ich habe in meiner ersten Mitteilung darauf hingewiesen, daß die Richtigkeit einer Rest-N-Bestimmung in erster Linie von der Art der Enteiweißung abhängt und habe mit „Essigsäuremethode“ und mit der Trichloressigsäureenteiweißung gute Resultate erhalten, während die Enteiweißung mit Phosphormolybdänsäure zu niedrige Werte ergab. Merkwürdigerweise eignen sich die beiden erstgenannten Methoden für Mikroverfahren nicht, während man mit Phosphormolybdänsäure nach Bang gute Werte erhalten kann. Wenn ich von den verschiedenen Stickstoffmethoden, auf die ich später zu sprechen komme, absehe, so kommen für die Mikro-Rest-N-Bestimmungen folgende Methoden in Betracht:

1. Methode Folin mit Methylalkohol.
2. Methode Bang. Filterenteiweißung mit Phosphormolybdänsäure.
3. Eigenes modifiziertes Verfahren.
4. Dialysierverfahren (eigene Methode).

Ich konnte bereits in meiner ersten Mitteilung zeigen, daß sich das Folinsche Enteiweißungsverfahren mit Methylalkohol weder für Makro- noch Mikro-Reststickstoffbestimmungen eignet. Fehler bis zu 100% sind nach Folins Mikromethode nicht ausgeschlossen.

Die eingangs erwähnten Bedenken gegen die Bangschen Mikroanalysen machen sich meiner Ansicht nach bei Rest-N-Bestimmungen besonders geltend. Ich konnte in 50 Analysen in keinem einzigen Fall eine quantitative Enteiweißung erreichen.

Folgendes modifizierende Verfahren läßt sich für Mikro-Rest-N-Bestimmungen verwenden:

5 ccm Plasma werden im Becherglas mit einer 50 ccm-Phosphormolybdänsäure versetzt. Nach einstündigem Stehen wird filtriert, mit Wasser nachgewaschen und im Filtrat eine Mikro-Kjeldahl-Bestimmung ausgeführt. Da die Phosphormolybdänsäurelösung immer etwas NH_3 enthält, muß vor jeder Bestimmung ein Blindversuch angestellt werden. Übrigens sind bei allen Mikro-Stickstoffbestimmungen Blindversuche sehr zu empfehlen, da sowohl die Luft des Laboratoriums als auch die Chemikalien meistens selbst bei größter Achtsamkeit Ammonsalze bzw. Ammoniak enthalten. Die Phosphormolybdänsäure wird nach der Vorschrift von Bang folgendermaßen bereitet:

10 g phosphormolybdänsaures Natrium und 10 g Glaubersalz werden unter Zusatz von 10 bis 20 Tropfen 20%-Natronlauge in 150 ccm Wasser unter Erwärmen gelöst. Nach dem Abkühlen führt man die Salzlösung in einen 3 l-Meßkolben über, spült nach und setzt 30 g konzentrierte reinste H_2SO_4-Merck hinzu. Zusatz von 0,5 g Traubenzucker und Anfüllen mit 2 mal destilliertem Wasser bis zur Marke. Die Lösung muß unter sorgfältigstem Verschluß aufbewahrt werden.

Die nach dieser Vorschrift erhaltenen Resultate sind nur dann zu verwenden, wenn sie mit einer anderen Methode übereinstimmen. Es kann leicht passieren, daß die Enteiweißung nicht quantitativ ist.

Ich habe versucht, das Abderhaldensche Dialysierverfahren für Rest-N-Bestimmungen zu verwenden. Dieser Bestimmungsart liegt folgende Überlegung zugrunde: Während das Eiweiß als Kolloid nicht durch tierische Membranen hindurchdiffundiert, sind die N-haltigen Bestandteile des Blutes wie Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Kreatin, Aminosäuren und Peptone sehr gut dialysierbar. Wenn daher der Rest-N nur aus solchen und nicht auch aus nichteiweißartigen, aber nichtdialysablen Substanzen besteht, so muß durch Dialyse eine Trennung der Eiweißkörper von den übrigen N-haltigen Blutbestandteilen möglich sein. Die Resultate meiner Versuche bestätigen diese Vermutung. Es gelingt mittels Dialyse auf die denkbar einfachste Art unter Anwendung von nur 3 ccm Plasma eine Rest-N-Bestimmung auszuführen. Ich verwende die Dialysierhülsen von Schleicher & Schüll, die vor jeder Bestimmung sorgfältig auf ihre Undurchlässigkeit für Eiweiß geprüft werden müssen. Je eine Hülse wird mit 3 ccm Plasma beschickt und gegen 15 ccm destilliertes sterilisiertes Wasser bei 15° im geschlossenen Gefäß dialysiert. Innen- und Außenflüssigkeit werden mit Toluol gerade überschichtet. Nach 24 Stunden wird in 10 ccm des Dialysates eine Mikro-Stickstoffbestimmung ausgeführt. Bei der Durchführung der Bestimmung ist peinlichste Sauberkeit zu beobachten. Es ist von größter Wichtigkeit, die Fäulnis und Zersetzung der Eiweißkörper hintanzuhalten, da die beim Eiweißabbau durch Bakterien oder Fermente entstehenden Abbauprodukte dialysabel sind und man daher zu hohe Rest-N-Werte erhalten würde. Es empfiehlt sich daher, steril zu arbeiten. Die ausführliche Beschreibung dieser Methode erfolgt an anderer Stelle.

Die große Einfachheit dieser Methode läßt es merkwürdig erscheinen, daß das Dialysierverfahren bisher in der quantitativen Analytik keine Anwendung gefunden hat, doch habe ich in der Literatur keine einzige Angabe über Rest-N-Bestimmungen mittels Dialyse gefunden. Dieses Dialysierverfahren erscheint mir auch biologisch interessant, da wir dadurch den Begriff des Reststickstoffes etwas besser als bisher fassen können in der Weise, daß der gesamte nichtkoagulable Stickstoff des Blutes dialysablen Substanzen angehört.

4. Stickstoffbestimmungen.

Während es bei Makro-Rest-N-Bestimmungen ziemlich gleichgültig ist, wie die Bestimmung des Stickstoffes durchgeführt wird und es einzig und allein auf die Art der Enteiweißung ankommt, muß bei der Mikro-Rest-N-Bestimmung der N-Bestimmung größte Aufmerksamkeit gewidmet werden.

Für die Mikro-Stickstoffbestimmung stehen uns drei prinzipiell verschiedene Methoden zur Verfügung:

1. Mikro-Dumas-Methode von Pregl,
2. Mikro-Kjeldahl-Methode von Pregl, Bang und Abderhalden,
3. Neßlerisation von Folin und W. Denis.

Von jedem dieser Verfahren sind zahlreiche Modifikationen bekannt, die die Art der Destillation und Titration betreffen. Methode 1 und 3 können von vornherein für Blutanalysen ausgeschaltet werden. Die Mikro-Dumas-Methode ist viel zu langwierig und erfordert einen sehr komplizierten, teueren Apparat, die Neßlerisation ist zu ungenau. Für die Destillation kommen folgende Modifikationen in Betracht:

1. Wasserdampfdestillation nach Pregl,
2. Durchsaugen eines Luftstromes nach Folin und Abderhalden,
3. Destillation nach Bang.

Tabelle VI.

Rest-N-Bestimmungen im Blute bei verschiedenen Erkrankungen[1]).

Datum	Name	Diagnose	Gesamtblut		Plasma		Serum	
			Essigsäure	Dialyse	Essigsäure	Dialyse	Essigsäure	Dialyse
16. XII. 18	Knes.	Erythämie	14,14	14,04	20,50	20,30	23,70	23,72
10. I. 19	Anna Haud.	Nephritis acuta	117,24	117,20	135,95	135,00	—	—
24. I.	Schuster	„ chronica	—	—	95,72	95,70	—	—
8. II.	Leop. Schimpel	Pneumonie	32,72	—	36,90	36,50	—	—
12. II.	Rosa Franke	Nephritis	75,16	—	130,68	130,63	—	—
10. III.	Barbara K.	Urämie	120,42	—	135,37	135,48	—	—
18. III.	Mathilde Schm.	Myodegeneratio	—	15,80	27,30	27,94	—	—
29. III.	Emilie Pfitz	Nephritis	53,31	—	100,54	100,48	100,00	100,39
8. IV.	Johanna Fröhl.	Nephritis	80,55	—	135,43	136,32	—	138,40
18. IV.	Marie Schefrik	Anurie	67,44	—	112,43	112,45	115,02	115,09

[1]) Über die Verteilung der diffusiblen Substanzen auf Gesamtblut, Plasma und Serum unter normalen und pathologischen Verhältnissen vgl. die vorläufige Mitteilung von W. Falta, Wiener klin. Wochenschr. 1919.

Tabelle VII.

Rest-N-Bestimmungen im Plasma bei Normalen
(auf 100 ccm berechnet).

Datum	Name	Diagnose	Alter	Rest-N Makro Essigsäure mg	Rest-N Mikro Dialyse mg
6.III.19	Camillo T.	abgeklung. Grippe	—	14,72	14,75
21.III.	Anton B.	do.	—	—	21,04
24.III.	Franz H.	normal	32	11,92	11,64
15.IV.	Friedr. M.	do.	31	16,92	16,57
21.IV.	Berthold M.	do.	26	15,72	15,98

Tabelle VIII.

Rest-N-Bestimmungen im Plasma bei Grippekranken
(auf 100 ccm berechnet).

Datum	Name	Diagnose	Alter	Rest-N Essigsäure mg	Rest-N Dialyse mg
29.XI.18	Kim.	Grippe, Pneumonie	57	167,40	—
2.XII.	Marie Lan.	Grippe, Pneumonie, akute Nephritis	18	200,40	200,50
4.XII.	Joh. Smet.	Grippe, Pneumonie	17	—	157,40
4.XII.	Therese Nebenf.	do.	47	220,71	220,59
7.XII.	Marie Nagelofen	Grippe, Pleuritis	39	85,28	85,18
14.XII.	Julie Reloö	Grippe	—	198,94	197,98
14.XII.	Josefa Dwo.	do.	30	240,72	239,44
8.I.19	Susanna Wallner	Grippe, Pleuritis	—	114,70	112,74
8.II.	Leop. Schimpel	Pneumonie, Grippe?	—	36,85	36,52
4.IV.	Anna Geist.	Pneumonie, Grippe	—	134,59	134,60

Tabelle IX.

N-Bestimmungen im Harn eines normalen Individuums bei gemischter Kost
(Gesamtmenge in Gramm).

Datum	Harnmenge	Spez. Gewicht	Makro-Kjeldahl Methylrot g	Makro-Kjeldahl alizarinsulfosaures Na	Mikro-Kjeldahl Pregl	Mikro-Kjeldahl Abderhalden
11./12. II. 19	1140	1011	20,74	20,76	20,70	20,72
14./15. II.	920	1015	14,81	14,81	14,79	14,72
18./19. II.	950	1015	17,39	17,37	17,40	17,39
19./20. II.	1040	1014	11,54	11,52	11,56	11,50
20./21. II.	1090	1015	15,92	15,90	15,87	15,62

Tabelle X.

N-Bestimmungen in einer Harnstofflösung nach verschiedenen Methoden.

Autor	Methodik	Indicator	Titration	N g %
Kjeldahl	Makro	Kongorot	$^n/_{10}$-NaOH	4,96
Pregl	Mikro	Methylrot	$^n/_{70}$-NaOH	4,90
Abderhalden	do.	alizarinsulfosaures Natrium	$^n/_{100}$-NaOH	4,90
Bang	do.	Stärke	$^n/_{200}$-$Na_2S_2O_3$	4,94
Pregl	do.	Stärke	$^n/_{200}$-$Na_2S_2O_3$	4,95

Die Versuche der Tabelle X zeigen, daß die Art der Destillation ohne Einfluß auf das Resultat der N-Bestimmung ist. Die Methode von Pregl ist insofern vorzuziehen, als die Wasserdampfdestillation schneller und ohne Stoßen verläuft. Für die Titration haben sich folgende Methoden bewährt.

1. Acidimetrische Titration:
   Pregl mit $^n/_{70}$-HCl und $^n/_{70}$-NaOH, Indicator: Methylrot.
   Abderhalden mit $^n/_{100}$-HCl und $^n/_{100}$-NaOH, Indicator: alizarinsulfosaures Natrium.
2. Jodometrische Titration:
   Bang mit $^n/_{200}$-Natriumthiosulfat und Stärke als Indicator.

Von diesen Methoden ist die Bangsche Titration am meisten zu empfehlen. Wir wissen, daß selbst gebrauchte Jenenserglasgeräte etwas Alkali abgeben können. Bei der Acidimetrie in verdünnten Lösungen macht sich ferner, wie Bang beobachtet hat, die hydrolytische Dissoziation des NH_4Cl und des $(NH_4)_2SO_4$ so stark geltend, daß man keinen scharfen Farbenumschlag erzielen kann. Ich kann für Mikro-Rest-N-Bestimmungen folgendes Verfahren empfehlen:

1. Vor einer jeden Untersuchungsreihe Durchführung eines Blindversuches.
2. Enteiweißung mittels Dialyse.
3. Verbrennung und Destillation des Stickstoffes nach Pregl.
4. Titration mit $^n/_{200}$-$Na_2S_2O_3$ nach Bang.

Literatur.

Albert, B., Beitrag zur Methodik der Reststickstoffbestimmung im Blut. Diese Zeitschr. 92, 397, 1918.

Abderhalden, Emil, und Andor Fodor, Mikro-Kjeldahl-Methode. Zeitschr. f. physiol. Chem. 98, 190, 1917.

Bang, Ivar, „Methode zur Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile“. Wiesbaden 1916.

Derselbe, Über die Mikrobestimmung des Blutzuckers. Diese Zeitschr. 87, 248, 1918.

Derselbe, Ergänzende Bemerkungen über die Mikromethode des Blutzuckers. Diese Zeitschr. 92, 244, 1918.

Boock, Josef C., und Stanley R. Benedict, An Examination of the Folin Farmer Method for the Colorimetric Estimation of Nitrogen. Journ. of Biolog. Chem. 20, 47, 1914.

Garner-Bennet, Hugo, Ein Kjeldahl-Apparat, der weniger Raum beansprucht. Chem. Centralbl. 2, 595, 1914.

Csonka, Frank A., Der Einfluß von verfüttertem Eiweiß, Kohlenhydraten und Fett auf den Blutzucker usw. Chem. Centralbl. 2, 591, 1917.

Donau, J., Die Arbeitsmethoden der Mikrochemie. Stuttgart 1913.

Fieldner, Arno C., und Carl A. Taylor, Vergleich der verschiedenen modifizierten Kjeldahl-Methoden mit der Dumas-Methode zur Best. von N usw. Chem. Centralbl. 1, 1018, 1915.

Talk, K. George, und Kanemalser Siginra, Vergleichende Versuche über die Durchlüftungsmethode und die Erhitzungsmethode der Kjeldahlschen Stickstoffbestimmung. Chem. Centralbl. 2, 843, 1916.

Folin, Otto, und W. Denis, Stickstoffbestimmung durch direkte Neßlerisation I bis V. Chem. Centralbl. 1, 824, 825, 1917.

Folin, Otto, und Ch. J. Farme, A new Method for the Determination of total Nitrogen in Urine. Journ. of Biolog. Chem. 2, 493, 1913.

Gulick, Addison, Vereinfachung der colorimetrischen Gesamt-N-Bestimmung. Chem. Centralbl. 2, 1208, 1914.

Hollinger, Robert, Einige Abänderungen der Methode des Stickstoffes nach Kjeldahl. Chem. Zeitschr. 1, 1698, 1914.

Jensen, Ove F., Ein Vergleich der Gunning-Kupfermethode mit der Kjeldahl-Gunning-Arnold-Methode zur Bestimmung des Stickstoffes. Chem. Centralbl. 1, 1017, 1915.

Kober, Philipp Adolf, Die Wirksamkeit der Durchlüftungsmethode bei der Destillation von Ammoniak. Chem. Centralbl. 1, 690, 1917.

Kochmann, M., Über die Vereinfachung d. Mikro-Kjeldahl nach Bang usw. Diese Zeitschr. 63, 479, 1914.

Kahn, R. L., Das Verfahren von Folin und W. Denis zur Bestimmung von N durch direkte Neßlerisation usw. Chem. Centralbl. 2, 911, 1917.

Lagers, G. H. G., Über die Gesamtstickstoffbestimmung. Chem. Centralbl. 2, 703, 1917.

Jungdahl, Malte, Zur Methodik der Stickstoffbestimmung im Harn. Diese Zeitschr. 83, 115, 1917.

Mosenthal, Die Beziehungen zwischen Wasser und Glucosekonzentration des Blutes. Chem. Centralbl. 2, 882, 1917.

Nolte, Otto, Über Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl. Zeitschr. f. anal. Chem. 54, 259, 1915.

Pearce, R. G., A Criticism of the Bang and Lewis Benedict Methods for the Estimation of Blood Sugar. Journ. of Biolog. Chem. 22, 525, 1915.

Pregl, Fritz, Die quantitative organische Mikroanalyse. Berlin 1917.

Pitter, R. S., und R. S. Snyder, Löslicher Nichtproteinstickstoff des Bodens. Chem. Centralbl. 2, 237, 1916.

Sahlstedt, A. W., Erfahrungen über Mikro-Kjeldahl-Bestimmung. Chem. Centralbl. 1, 2121, 1914.

Taylor, Alonzo E., and Florenze Hulton, On the Estimation of non Protein Nitrogen and Glucose in Finger Blood. Journ. of Biolog. Chem. 22, 63, 1915.

Underhill, Frank P., Studium über Kohlenhydratstoffwechsel XI, XII, XIII. Chem. Centralbl. 1, 104, 1917.

Wolf-Joachimowitz, Alice, Zur Vermeidung von Ammoniakverlust bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl. Chem. Zeitschr. 41, 87, 1917.

Wolf, Charles G. L., Bestimmung des eiweißhaltigen Stickstoffes und des Harnstickstoffes im Blute. Chem. Centralbl. 1, 1915, 1915.

Wunder, Max, und Octavian Laskar, Neue Abänderung der Kjeldahl-Methode zur Bestimmung des Stickstoffes in organ. Substanz. Chem. Centralbl. 1, 114, 1915.

Der Stoffwechsel bei der progressiven Paralyse[1]).

Von

Rudolf Allers.

(Eingegangen am 15. Mai 1919.)

I. Einleitung.

Eine Reihe von Tatsachen hat seit längerer Zeit die Annahme mehr oder weniger tiefgreifender Stoffwechselstörung bei der progressiven Paralyse nahegelegt. Einerseits waren es Beobachtungen über den Ernährungszustand und das Verhalten des Körpergewichts bei diesen Kranken, andererseits theoretische Erwägungen, besonders das Bemühen, die relative Seltenheit der Paralyse als Späterscheinung der Syphilis und das lange Intervall zwischen Infektion und Krankheitsausbruch zu deuten, die zu dieser Annahme führten. Doch hat es an genaueren Versuchen, die Natur dieser hypothetischen Allgemeinerkrankung näher zu bestimmen, ja selbst ihr Bestehen einwandfrei sicherzustellen, nahezu völlig gefehlt. Denn die Untersuchungen, die sich mit diesem Problem befaßten, haben sich entweder mit Einzelfragen abgegeben, ohne zu einem Gesamtbilde zu führen, oder krankten an mehr oder weniger schwerwiegenden methodischen Unzulänglichkeiten. Es erschien daher geboten, in möglichst ausgedehnten und exakten Versuchen das Verhalten des Stoffwechsels bei dieser Erkrankung zu studieren, um vorerst einmal die Frage beantworten zu können, ob überhaupt von einer Allgemeinerkrankung die Rede sein könne,

---

[1]) Da äußere Umstände mich derzeit an der Fortsetzung dieser in der Münchner psychiatrischen Klinik durchgeführten Versuche hindern, halte ich es für nicht unangebracht, die bisher gewonnenen Ergebnisse hier kurz zusammenzufassen.

und — falls sich eine solche in der Tat erweisen ließ — zu versuchen, sie näher zu kennzeichnen und womöglich einheitlich zu interpretieren.

Die bisher abgeschlossenen Untersuchungen erstrecken sich auf folgende Bestimmungen: Stickstoffbilanz, Menge des Harnstoffs, des Ammoniaks, der Aminosäuren — d. h. des formoltitrierbaren Stickstoffs im Harn —, der Harnsäure und Purinbasen, die Verteilung des Harnschwefels und Harnphosphors, Verhalten des Kreatinins, Kreatins, der Glykuronsäure, der Phenole, des Indicans, Menge der Oxyproteinsäuren, der flüchtigen Fettsäuren, den Gang der Hippursäuresynthese. Einzelne Versuche hatten die Bestimmung der Lipoide und des Cholesterins im Blute, des ätherlöslichen Phosphors in den Faeces zum Gegenstand. Eine besondere Versuchsreihe befaßte sich mit dem Verhalten der aus dem Harn durch Phosphorwolframsäurefällung zu gewinnenden Stoffe.

Der folgenden Darstellung sind die Ergebnisse von 7 umfänglichen, möglichst den gesamten Stoffwechsel umfassenden Stoffwechselversuchen zugrunde gelegt, ferner Einzelversuche über Kreatininausscheidung, Purinstoffwechsel, Hippursäuresynthese, Menge der flüchtigen Fettsäuren und Oxyproteinsäuren an insgesamt etwa 30 Versuchspersonen. In allen Fällen handelte es sich um klinisch und serologisch einwandfrei festgestellte progressive Paralyse, meist in ziemlich vorgeschrittenen, aber unkomplizierten Stadien. Es wurde besonderer Wert darauf gelegt, das Bild nicht durch irgendwelche Komplikationen, wie etwa paralytische Anfälle, schwere Erregungs- oder Stuporzustände zu trüben, um möglichst einwandfrei die Grundzüge einer etwaigen Allgemeinerkrankung auffinden zu können.

Die Stoffwechselversuche sind durchweg bei purinfreier Kost angestellt worden, zu der behufs Untersuchung des exogenen Nucleinumsatzes 10 g Natrium nucleinicum Merck zugelegt wurden. Hinsichtlich der chemischen Methodik ist nichts Besonderes zu sagen; es wurden die üblichen Verfahren angewendet. Der Harnstoff wurde teils nach Mörner-Sjöquist, in der Folinschen Modifikation, teils nach Pflüger-Bleibtreu-Schöndorff bestimmt. Beide Methoden gaben nebeneinander angewendet die gleichen, höchstens um 0,15 % differierenden Werte. Mit Rücksicht auf die im Laufe der Ver-

suche gefundene Vermehrung des mit Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffanteils im Harn der Paralytiker wurde späterhin der zweitgenannten Methode der Vorzug gegeben. Ammoniak und formoltitrierbarer Stickstoff wurden nach Frey-Gigon bestimmt, wobei stets 4 bis 5 Stunden lang durchlüftet wurde[1]). Die Purinkörper wurden nach Krieger-Schmid, das Kreatinin und Kreatin colorimetrisch nach Autenrieth-Müller bestimmt. Der Gesamtphosphor wurde mit Uranacetat nach Veraschung mit Schwefelsäure und Ammoniumnitrat, die Phosphorsäure in üblicher Weise direkt titriert. Anorganisch und organisch gebundene Schwefelsäure wurden mit Chlorbarium gefällt, der Gesamtschwefel nach Veraschen mit Natriumsuperoxyd nach Abderhalden-Pringsheim. Es sei hier auf die von S. Fränkel beschriebene Titration der drei Schwefelfraktionen nach dem Vorgang von E. Freund[2]) aufmerksam gemacht, die sich sehr gut bewährte. Das Indican wurde als Indigo nach Wang-Maillard mit Kaliumpermanganat, die Phenole mit Jod durch Destillation nach Koßler-Penny-Neuberg titriert, die Glykuronsäure als Furfurolphloroglucid gewogen. Die Bestimmung der Oxyproteinsäuren geschah nach Salomon und Saxl. Die freien Fettsäuren wurden nach einer dem Weldeschen Verfahren nachgebildeten Methode ermittelt. Um den Gang der Hippursäuresynthese zu verfolgen, wurde Gesamtbenzoesäure nach Folin, die Hippursäure als Maximalwert durch die Stickstoffbestimmung im Essigätherextrakt des sauren Harnes bestimmt. Kontrollversuche an normalen Harnen und solchen, denen gewogene Mengen von Hippursäure zugesetzt waren, ergaben sehr befriedigende Resultate.

Selbstverständlich wurden alle Harne täglich auf Eiweiß, Zucker, Aceton usw. untersucht, sowie Reaktion und spezifisches Gewicht bestimmt.

---

[1]) Zahlreiche Versuche, die ich und die Kempner (Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. **11**, 482, 1912) angestellt haben, überzeugten uns, daß die quantitative Übertreibung des Ammoniaks nur selten in 2 Stunden beendet ist, wie das Frey und Gigon (diese Zeitschr. 22, 309, 1909) behauptet hatten, daß aber anderseits die Behauptung von Fuchs, der noch nach 6- bis 8stündiger Durchlüftung eine Vermehrung des übergegangenen Ammoniaks fand, anscheinend nicht zutrifft.

[2]) Vgl. Neuberg, Der Harn **1**, 143.

Vielleicht sind einige Worte über die Methodik von Stoffwechselversuchen an Geisteskranken im allgemeinen nicht unnütz. Solche Versuche erfordern infolge der Eigenart der Versuchspersonen ein ganz besonders aufmerksames und gut geschultes Personal. Denn den Kranken selbst zur Einhaltung irgendwelcher Vorschriften zu bewegen, ist natürlich sehr oft ein ganz aussichtsloses Beginnen: und auch in jenen seltenen Fällen, bei denen der Kranke guten Willen und Verständnis zeigt, ist man ja nie sicher, ob diese Einstellung während der ganzen Versuchsdauer vorhalten wird. Man ist also durchaus auf das Pflegepersonal angewiesen. Der Stab, über den die Klinik verfügte, war nun der denkbar beste; wiederholte Kontrollen überzeugten uns von der exakten Einhaltung der den Pflegern und Schwestern eingehändigten detaillierten schriftlichen Instruktion. Besonderes Gewicht muß man darauf legen, daß das Pflegepersonal angewiesen werde, alle Störungen des Versuches zu melden, wie sie teils durch unvermeidliche gelegentliche Unaufmerksamkeit, teils recht oft durch unerwartetes Verhalten des Kranken gezeitigt werden. Man kann geradezu sagen, daß die Sicherheit, bei einem Versuch wirklich alle Bedingungen zu kennen, mit der Zahl der Versuche wächst, die infolge derartiger Störungen aufgegeben oder unterbrochen werden mußten. Wenn irgend möglich, soll die Versuchsperson in einem Einzelzimmer oder einem höchstens dreibettigen Raum gehalten und der Aufsicht einer eigens dazu bestimmten Pflegeperson anvertraut werden. Wichtig ist es, sich davon zu überzeugen, daß bei einem Wechsel der Pflegepersonen, insbesondere beim Schichtwechsel zwischen Tag- und Nachtpflege, die neu Eintretenden nicht nur die schriftliche Instruktion übernehmen, sondern sie auch völlig verstehen. In unserem Falle war die Sachlage insofern besonders günstig, als die Mehrheit der Pfleger und Schwestern schon längere Zeit im Dienste der Klinik standen und vor Beginn der Versuchsreihe schon viele Stoffwechselversuche mitgemacht hatten.

II. Die Versuchsergebnisse.

Aus Gründen der Raumersparnis begnüge ich mich, die Ergebnisse der Versuche in großen Linien zu skizzieren. Hinsichtlich des Zahlenmaterials muß auf die bisherigen Veröffentlichungen, insbesondere die III. und IV. Mitteilung[1]) verwiesen werden.

Die Resorption der stickstoffhaltigen Nahrungsbestandteile weist bei der progressiven Paralyse keine Störung auf. Die Stickstoffwerte des Kotes waren normal[2]). Dagegen weist der

[1]) S. Allers, Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. 18, 1, 1913 und Serejski, ebenda 18, 491, 1913.

[2]) Ob nicht in manchen Fällen oder Stadien der Erkrankung auch Störungen der Resorption vorkommen, muß natürlich dahingestellt bleiben, wie überhaupt jede Verallgemeinerung aus den bisherigen Versuchen nur den Charakter einer vorläufigen Annahme tragen kann.

tägliche Gang der Stickstoffausscheidung erhebliche Ungleichmäßigkeiten auf, indem Tage oder Perioden mit Stickstoffretention und wiederum vermehrter Ausfuhr einander regellos folgen. Dabei hat es den Anschein, als ob diese Störung an eine gewisse Progredienz des Krankheitszustandes gebunden wäre. Hierfür spricht insbesondere die Erfahrung bei einem Fall, der zweimal — zuerst in einem der Remission nahekommenden, dann in einem Stadium der rapiden Progredienz — untersucht wurde. Die genannte Erscheinung zeigte sich nur in der zweiten Krankheitsphase. Die Schwankungen der Stickstoffausscheidung sind zuweilen, keineswegs aber regelmäßig, von solchen der Harnmenge begleitet, so daß man gelegentlich auftretende hohe Werte für den Harnstickstoff schwerlich wird als eine Ausschwemmung ansehen können. Übrigens zeigte gerade ein Fall, der bei einer täglichen N-Zufuhr von etwa 12 g Tagesunterschiede von 4 bis 5 g aufwies, ein ziemlich konstantes Verhalten der Harnmenge. Über den Calorien- und Stickstoffbedarf erlauben die bisherigen Versuche noch keine Schlüsse. In progredienten Phasen der Erkrankung ist die Stickstoffbilanz während länger dauernder Versuchsperioden — und nur solche können angesichts der erwähnten Ungleichmäßigkeiten der Ausscheidung herangezogen werden — auch bei ziemlich hoher Zufuhr negativ.

Mit den Schwankungen der Wasserabgabe hängen offenbar die schon von vielen Autoren beobachteten und auch von uns angetroffenen Schwankungen des Körpergewichts zusammen. Auch bei negativer Stickstoffbilanz tritt bei gleichzeitig verringerter Harnmenge gelegentlich ein Ansteigen des Körpergewichts auf.

Der tägliche Gang der Schwefelausscheidung geht im allgemeinen dem der Stickstoffausscheidung parallel, wenn auch die Schwankungen nicht ganz so ausgeprägte sind. Bemerkenswert ist es, daß bei einigen Fällen der Quotient N : S niedriger gefunden wurde, als es der Zusammensetzung der Nahrung entsprochen hätte.

Auffallender noch als die bisher beschriebenen Erscheinungen sind die Verschiebungen, die die Verteilung des Harnstickstoffs erfährt. Sehr häufig trifft man eine beträchtliche relative Verminderung des Harnstoffes bis auf etwa 50%

des Gesamtstickstoffes an, ohne daß zwischen Höhe und Richtung der Schwankungen der Gesamtstickstoffausscheidung und den prozentualen Harnstoffwerten ein erkennbarer Zusammenhang bestünde. Auch zwischen dem Verhalten des Ammoniaks und des Harnstoffs findet sich keinerlei Parallelismus. Wenn gelegentlich eine absolute und relative Zunahme des Ammoniaks vorkam, so fanden sich anderseits Tage, an denen ein tiefes Absinken der relativen Harnstoffwerte mit ganz normalen Ammoniakzahlen einherging. Aber auch an den Tagen der Ammoniakvermehrung ist der in dieser Form ausgeschiedene Stickstoff nicht ausreichend, das Harnstoffdefizit zu decken. (Da die Harne stets frisch verarbeitet wurden und immer deutlich saure Reaktion zeigten, ist die Möglichkeit sekundärer Zersetzungen auszuschließen.)

Der formoltitrierbare Stickstoff wies gelegentlich einige Schwankungen der Ausscheidung auf, die aber nicht bedeutend waren. Zur Zeit von Anfällen steigt sowohl in der prä- als in der postparoxysmalen Periode dieser Stickstoffanteil an, wie das auch bei andersartigen Krampfanfällen von Kempner[1]) schon beschrieben wurde.

Parallel dem Absinken der relativen Harnstoffwerte, aber weitgehend unabhängig von den Schwankungen der Ammoniakausscheidung findet sich eine starke Vermehrung des Neutralschwefels (bis zu 30% des Gesamtschwefels), die indes auch gelegentlich vorkommt, ohne gleichzeitige Verminderung des Harnstoffs. Die Ätherschwefelsäuren hingegen zeigten normale Werte. Auch der organisch gebundene Phosphor war, besonders in progredienten Phasen, oft nur anscheinend z. T. parallel dem Neutralschwefel vermehrt. Die endogenen Purine werden in annähernd normaler oder verminderter Menge ausgeschieden. Auch hier findet man von Tag zu Tag große Schwankungen, die vielleicht zuweilen von der Harnmenge abzuhängen, zum Teil aber auch selbständig zu erfolgen schienen. Die Purinbasen sind fast immer relativ, oft sehr bedeutend vermehrt; ein Viertel des gesamten Purinstickstoffes kann in Gestalt der Basen erscheinen.

Das Kreatinin als solches sowohl als auch das Kreatin

---

[1]) a. a. O.

waren meist erheblich vermindert. Auch hier besteht ein Zusammenhang zu dem Zustandsbilde, in dem es sich zeigte, daß bei rascherem Fortschreiten des Krankheitsprozesses sich regelmäßig diese Verminderung auch bei jenen Fällen einstellte, die sie zunächst hatten vermissen lassen[1]). Im Zusammenhang mit diesem Verhalten des Kreatinins dürfte es stehen, daß sich aus dem Harn der Paralytiker eine nicht unbeträchtliche Menge von Methylguanidin isolieren ließ (0,125 g im Liter Harn gegen 0,025 bei Gesunden[2]).

Die Oxyproteinsäuren zeigen meist eine deutliche Vermehrung[3]). Ihr Stickstoffgehalt reicht aber nicht aus, das durch die Verminderung des Harnstoffs entstehende Stickstoffdefizit bzw. die ganze Menge des Reststickstoffs, der bis 22 % des Harnstickstoffs enthalten kann, zu erklären. Immerhin geht die Ausscheidung dieser Substanzen wie die des Neutralschwefels der des Reststickstoffs ziemlich parallel. Daß noch andere stickstoffhaltige Substanzen an der Zusammensetzung des Reststickstoffs beteiligt sein müssen, lehrt übrigens auch die Beobachtung Serejskis[4]), der zuweilen einen sehr hohen Stickstoffgehalt des sauren Essigätherauszuges fand ohne entsprechende Vermehrung der Benzoesäure, so daß es sich keinesfalls um Hippursäure gehandelt haben kann.

Wie schon oben angemerkt, ist auch der mit Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoffanteil abnorm hoch. Ein Versuch, die in diesem Niederschlag enthaltenen Stoffe näher zu charakterisieren, führte noch zu keinem abschließenden Ergebnis. Die Aufarbeitung geschah nach den von Kutscher und seinen Schülern angegebenen Methoden. Anscheinend ist das Histidin vermehrt, da eine in den physikalischen Eigenschaften mit dem von Engeland sowie von Abderhalden und Einbeck beschriebenen Dipikrolonat übereinstimmende Fällung mit alkoholischer Pikrolonsäure erhalten

---

[1]) Mitteilung VI (noch nicht veröffentlicht), z. T. nach Versuchen, die Herr Achúcarro in meinem Laboratorium angestellt hat.

[2]) Vgl. Achelis, Zeitschr. f. physiol. Chem. **50**, 10, 1906.

[3]) Neumann, Mitteilung V. Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. **27**, 1915.

[4]) Mitteilung IV.

werden konnte. Der Versuch, Methylpurine nachzuweisen, mißlang.

Aceton, Acetessigsäure, Eiweiß oder Zucker wurden nicht gefunden. Das Verhalten der Phenole, des Indicans und der Glykuronsäure bietet zu keinerlei Bemerkungen Anlaß.

Bei gelegentlich vorgenommenen Koständerungen — systematische Versuche in dieser Richtung wurden nicht angestellt — ergab sich eine auffallende Unfähigkeit der Anpassung an den anderen Stickstoffgehalt der Nahrung.

Der exogene Purinstoffwechsel — nach Verabfolgung von 10 g Natrium nucleinicum — ist schwer genau zu charakterisieren. Denn es zeigte sich, daß die Verabfolgung dieser Substanz eine der dadurch gemachten Mehrzufuhr an Stickstoff keineswegs entsprechende, sie vielmehr erheblich übersteigende Steigerung der Stickstoffausscheidung nach sich zog. Auch die Verteilung des Harnstickstoffs erfuhr in der Nucleinperiode eine Veränderung. Regelmäßig nämlich stieg die Kreatininmenge an. Auch stiegen durchschnittlich die relativen Harnstoffwerte, doch kamen auch gelegentlich während der Nucleinperioden niedrige Harnstoffprozente vor.

Soviel nur läßt sich mit einiger Bestimmtheit sagen, daß auch von den exogenen Purinkörpern jedenfalls der weitaus größere Anteil nicht in Gestalt von Harnsäure, sondern in der von Purinbasen die Niere passiert, die bis 60% des Purinstickstoffs umfassen können.

Führt man einem Paralytiker Benzoesäure zu, so versagt die Hippursäuresynthese selbst bei kleinen Mengen fast vollkommen. Je mehr Benzoesäure eingeführt wird, desto größer ist die relative Menge der frei im Harn erscheinenden Säure. Die Zufuhr von Benzoesäure hat aber eine gesteigerte Stickstoffausscheidung zur Folge.

Von sonstigen Versuchsergebnissen wären etwa folgende noch zu erwähnen. In Übereinstimmung mit Beumer[1]) konnte eine Vermehrung des ätherlöslichen Phosphors, also der phosphorhaltigen Lipoide im Stuhle der Paralytiker — wie sie von Peritz[2]) behauptet worden war — nicht festgestellt werden.

[1]) Über Lecithinausscheidung bei Tabes und Paralyse. Inaug.-Diss. München 1909.

[2]) Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 5, 1909.

Dagegen zeigte sich bei 2 Fällen, die daraufhin untersucht wurden, eine Vermehrung sowohl des Cholesterins — hauptsächlich das freie Cholesterin, weniger das als Ester gebundene — deutlich vermehrt, was die Angaben Pighinis[1]) bestätigen würde, während die Werte für den Lipoidphosphor nur in einem Fall die von Bornstein gefundenen Normalzahlen erheblich überstieg. Der Reststickstoff des Blutes war normal.

Die flüchtigen Fettsäuren des Harns[2]) waren meist nicht vermehrt; doch kommen gelegentlich Perioden stark vermehrter Ausscheidung vor. Zugeführte niedere Fettsäuren werden offenbar restlos verbrannt.

Salvarsaninjektionen üben auf den Stoffwechsel des Paralytikers irgendeinen, heute noch nicht näher zu bestimmenden Einfluß aus. Wir haben unter ihrem Einfluß sowohl die Werte für die freien Fettsäuren wie für die freie Benzoesäure weit über den Hippursäurewert hinaus ansteigen sehen.

III. Deutung der Versuchsergebnisse.

Wenn zwar die bisher angesammelten Erfahrungen über den Stoffwechsel bei der progressiven Paralyse bei weitem nicht ausreichen, um ein abschließendes Urteil über die Natur der vorliegenden Stoffwechselstörung zu gestatten, so scheint doch so viel schon ausgesagt werden zu können, daß diese Erkrankung zumindest in Perioden der Progredienz des Prozesses oder in vorgeschrittenen Stadien mit Alterationen des Stoffwechsels einhergeht, und zwar müssen offenbar die Erscheinungen von seiten des Stoffwechsels mit dem Grundprozeß irgendwie zusammenhängen. Denn sie wurden gefunden zu Zeiten, wo interkurrente Symptome, wie Erregungszustände, Stupor, Anfälle u. dgl., fehlten, und sie wiesen eine nicht zu verkennende Beziehung zu den klinischen Erscheinungen auf.

Trotz der relativ geringen Zahl der Versuche scheint es ferner angesichts der Einheitlichkeit des Bildes, das sich bei ihnen allen ergab, vielleicht nicht verfrüht, wenn eine hypothetische Deutung versucht wird. Die eingehende Begründung derselben und die Diskussion der verschiedenen Versuchsresul-

---

[1]) Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. 4, 629, 1911.

[2]) Mitteilung II. Ebenda 17, 228, 1913.

tate kann hier nicht ausführlich gebracht werden. Es muß in dieser Hinsicht auf die zitierten Veröffentlichungen verwiesen werden. Diese hypothetische Deutung kann, wie ausdrücklich festgestellt werden soll, natürlich nur für das untersuchte Stadium der Erkrankung Geltung beanspruchen. Wenn die Untersuchungen bei unsern Versuchspersonen, die das Bild der ruhig-dementen, vorgeschrittenen Paralyse zeigten, eine einheitliche Stoffwechselstörung annehmen lassen, so folgt daraus nicht, daß nicht der Stoffwechsel in anderen Phasen, etwa der initialen oder terminalen, ganz andere Züge aufweisen kann.

Ich glaube nun, daß die im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Veränderungen des Stoffwechsels sich ziemlich ungezwungen auffassen lassen als eine Steigerung des endogenen Abbaues bei gleichzeitigem Stehenbleiben desselben auf intermediären Stufen. Hierfür spricht m. E. die relative Harnstoffverminderung, die nicht auf eine Acidosis bezogen werden kann, die Zunahme des Neutralschwefels und Reststickstoffs, die relative Vermehrung der endogenen Purinbasen auf Kosten der Harnsäure, die Vermehrung der organisch gebundenen Phosphorfraktion und die Verminderung des Kreatinins und Kreatins bei gleichzeitiger Vermehrung des Methylguanidins. Auch das Verhalten des Paralytikerorganismus bei Zufuhr von Benzoesäure ist vollkommen mit dieser Hypothese in Einklang zu bringen. Das Versagen der Hippursäuresynthese kann entweder darauf zurückgeführt werden, daß das zur Paarung erforderliche Glykokoll nicht zur Verfügung steht, weil es nicht gebildet wird, oder darauf, daß der fermentative Prozeß versagt. Für die erstere Annahme würde die Tatsache der gesteigerten Stickstoffausfuhr nach der Darreichung der Benzoesäure, ein Anzeichen für einen auf den Reiz hin stattfindenden endogenen Eiweißzerfall, sprechen. Die auch bei reichlicher Eiweißzufuhr negative Stickstoffausfuhr zeigt jedenfalls, daß ein erheblicher Zerfall von Körpereiweiß stattfindet. Die qualitativen Veränderungen scheinen zu zeigen, daß dieser endogene Zerfall nicht bis zu den normalen Endprodukten abläuft.

Auch im exogenen Stoffwechsel scheinen — wenigstens gilt dies für den Nucleinumsatz — ähnliche Hemmungen eine Rolle zu spielen.

Mit dieser Hypothese ist aber noch gar nichts über die Beziehungen zwischen der Stoffwechselstörung und dem eigentlichen paralytischen Krankheitsprozeß ausgesagt. Wie bei allen Psychosen[1]) bestehen auch hier drei Möglichkeiten. Es kann die Allgemeinerkrankung Ursache des cerebralen Prozesses sein, wie wir das etwa bei urämischen Psychosen annehmen dürfen, sie kann Folge der Hirnerkrankung sein, etwa in Analogie der Wirkungen des Zuckerstiches, es könnten aber cerebrale und chemische Störungen beide koordinierte Folgen irgendeines Grundprozesses, etwa der Giftwirkung der im Organismus angesiedelten Spirochäten, sein. Welche Art der Abhängigkeit in der Tat vorliegt, muß unentschieden bleiben. Es dürfte auch der Stoffwechselversuch in der Psychiatrie hier kaum Aufklärung schaffen können, solange uns eingehende Untersuchungen über die physiologische Wechselwirkung zwischen Zentralnervensystem und Chemismus nicht die Basis gewonnen haben. So dürfte es auch müßig sein, zwischen den bei der progressiven Paralyse und anderen Erkrankungen anzutreffenden Stoffwechselstörungen Parallelen zu ziehen. Nur das eine verdient vielleicht angemerkt zu werden, daß — soweit meine Erfahrungen reichen — das beschriebene Bild sich bei anderen Psychosen und organischen Harnerkrankungen nicht finden läßt. Insbesondere zeigt ein anderer ebenfalls chronisch und mit Krampfanfällen verlaufender Prozeß, nämlich die genuine Epilepsie[2]), ein wesentlich anderes Bild des Stoffwechsels. Es scheint sich also vor der Hand — immer unter Einhaltung der verschiedenen oben angedeuteten Kautelen — der Schluß zu ergeben, daß die progressive Paralyse tatsächlich mit einer Allgemeinerkrankung vergesellschaftet ist, die sich auf dem Gebiet des Stoffwechsels kundgibt, und daß diese Allgemeinerkrankung oder Stoffwechselstörung die Möglichkeit einer hypothetischen, aber einheitlichen Erklärung bietet.

---

[1]) Allers, Ergebnisse stoffwechselpathologischer Untersuchungen I, Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psych. (Ref.) **4**, 737, 1911.

[2]) Allers, Journ. f. Psychol. u. Neurol. **16**, 137, 1910, und Allers und Sacristán, Zeitschr. f. d. ges. Neurol. u. Psychol. **20**, 305, 1913.

Über die Identität von Hordein und Bynin.

Von

Heinrich Lüers.

(Mitteilung aus der deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in München.)

(Eingegangen am 15. Mai 1919.)

Mit 1 Figur im Text.

Nach Th. Osborne[1]) enthält das Gerstenkorn folgende Eiweißkörper:

1. Wasserlösliches Albumin „Leucosin" ca. 0,3 %,
2. In Salzlösungen lösliches Globulin „Edestin" ca. 1,95 %,
3. Eine nicht näher charakterisierte Proteose in geringer Menge,
4. In ca. 75 %igem Alkohol lösliches Hordein ca. 4 %,
5. Unlösliches Proteid ca. 4,5 %.

Fast 40 % des Gesamteiweißes der betreffenden Gerste waren als „Hordein" vorhanden. Durch dieses quantitative Vorherrschen beansprucht dieser Eiweißkörper schon manches Interesse, das jedoch noch durch seine Eigenschaft, in 75 %igem Alkohol löslich zu sein, die es mit dem Gliadin des Weizens und dem Zein des Maises teilt, erhöht wird. Von praktischer Bedeutung endlich wird es auch dadurch, daß es bei der Keimung als Hauptreserveeiweißstoff aufgespalten und vom Keimling zum Aufbau der jungen Pflanze verbraucht wird. Es wird demgemäß auch für die Praxis der Malzbereitung und in gewissem Sinne auch für die Bierbrauerei ein Interesse besitzen.

---

[1]) Grießmayer, Die Proteide der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Ölsamen.

Osborne hat auch das fertige Malz untersucht und fand folgende Eiweißkörper darin vor:

Proteid, unlöslich in Salzlösungen und Alkohol . . 3,80 %
„Bynin“, löslich in 75 %igem Alkohol . . . . . 1,25 %
Bynedestin, Leucosin und Proteosen, löslich in Wasser und Salzlösung } gerinnbar 1,50 %, ungerinnbar 1,20 %

Aus der starken Abnahme des alkohollöslichen Proteids erkennt man ohne weiteres, daß es bei der Keimung die Hauptrolle als Reserveproteid spielt. Bei Ausführung der Elementaranalysen des „Hordeins“ und des alkohollöslichen Proteids des Malzes fand nun Osborne immer geringe Unterschiede, wie die Tabelle zeigt.

	Hordein aus Gerste %	Bynin aus Malz %
Kohlenstoff	54,29	55,03
Wasserstoff	6,80	6,67
Stickstoff	17,21	16,26
Schwefel	0,83	0,84
Sauerstoff	20,87	21,50

Auf Grund dieser Unterschiede in der Elementarzusammensetzung kommt Osborne zu dem Schluß, daß bei den Umwandlungen des Hordeins während der Keimung es selbst verschwindet und daß dafür ein neues, ebenfalls alkohollösliches Proteid mit anderer Zusammensetzung, dem er den Namen Bynin gibt, an seine Stelle tritt.

Da die Frage nach den Beziehungen beider Eiweißkörper in mehrfacher Richtung von Interesse ist, hat bereits W. Kraft[1]) sich eingehender mit dem Studium der Eigenschaften dieser zwei Proteide beschäftigt. Das Ergebnis seiner Studien ist etwa folgendes: Bynin und Hordein zeigen in ihren Löslichkeitseigenschaften gegenüber Alkohol verschiedener Konzentration nicht den geringsten Unterschied. Auch in ihrem Verhalten und den Spaltprodukten bei der Pepsinverdauung glichen sie sich weitgehend. Die Menge der Glutaminsäure, die beide bei vollständiger Säurehydrolyse liefern, ist für Bynin 28,04 %, für Hordein 32,9 % gewesen. Die Unterschiede bieten also

[1]) Dissertation Würzburg 1909, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **1910**, 193, 205.

keinen Anhaltspunkt für eine verschiedene Zusammensetzung. Auch die spezifische optische Drehung sowie ihre Löslichkeit in Wasser und sehr verdünnter Alkaliphosphatlösung zeigen bei beiden keine bemerkenswerten Verschiedenheiten. Endlich fand Kraft auch bei Verfolgung der Abnahme des Hordeins während der Keimung keinen Anhaltspunkt, der auf die Entstehung eines neuen Körpers schließen ließe. Zum Schluß seiner Ausführungen äußerte Kraft, daß wohl nur eine vollständige Hydrolyse Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung dieser beiden Eiweißkörper aufdecken könnte. Diese Sachlage nun war der Anlaß, weshalb ich zur Ausführung einer Hydrolyse der beiden Proteine schritt. Aus technischen Gründen wählte ich dafür nicht die Estermethode, da zu einer völligen Durchführung einer Hydrolyse immerhin 250 bis 300 g Substanz nötig sind, deren Beschaffung in den jetzigen Zeiten auf teilweise unüberwindliche Schwierigkeiten stößt, sondern die von van Slyke[1]) mit Erfolg eingeführte Methode, die uns zwar nicht die einzelnen Hydrolysenprodukte in Substanz liefert, sondern uns einen Überblick des Stickstoffs, verteilt auf 7 Gruppen, gibt. Bevor ich zur Beschreibung der Hydrolysen selbst übergehe, sei mit einigen Worten die Herstellung des Ausgangsmaterials geschildert.

1 kg Malzmehl, das von den Spelzen durch Absieben befreit worden war, und 1 kg Gerstengraupen, die durch Mahlen noch zerkleinert worden waren, wurden mit je 2 l 75 %igem Alkohol etwa 20 Stunden digeriert, mittels eines Koliertuches fest abgepreßt und durch Faltenfilter blank filtriert. Im klaren Filtrat wurden die Proteine Hordein und Bynin durch Eingießen in 2 l absolutem Alkohol in Form klebriger zäher Massen gefällt. Nach Abgießen der alkoholischen Lösung wurden die beiden Proteine durch Zusatz von Wasser und Alkohol und dauerndem Digerieren wieder in Lösung gebracht und diesmal durch Eingießen in viel destilliertes Wasser gefällt. Das Wiederlösen und Fällen, diesmal mit Alkohol, wurde noch 2 mal wiederholt, wobei die Eiweißkörper erst ausfielen, nachdem man 5 ccm einer etwa 10 %igen Magnesiumsulfatlösung zugesetzt hatte. Schließlich wurden die gefällten Proteide mit absolutem Alkohol und mehrmals mit Äther verrieben und im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd eine Woche unter öfterem Zerreiben getrocknet. In getrocknetem Zustand stellten die beiden Proteide ein schwach gelbbraun gefärbtes staubiges Pulver dar. Trotzdem wir bei der Herstellung den Angaben Osbornes folgten, gelang es uns nicht,

---

[1]) Abderhalden, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 5, 2, 1011.

ein phosphorfreies Produkt zu erhalten. Auch der Stickstoffgehalt beider Proteine blieb hinter dem von Osborne angegebenen zurück. Nach dreistündigem Trocknen bei 100° lieferte das

Hordein 13,40% N

und das

Bynin 12,82% N.

Es war also nicht möglich gewesen, stickstofffreie oder stickstoffarme Körper, die vom Hordein und Bynin hartnäckig durch Adsorption zurückgehalten werden, zu entfernen.

Die Ausbeute an beiden Eiweißkörpern war aus 1 kg Malz 8 g Bynin und aus 1 kg Gerste 11 g Hordein. Mit je 3 g der beiden Proteine wurde nun nach Angaben von van Slyke eine Hydrolyse vorgenommen. An Hand des Bynins sei der Gang der Hydrolyse und der der Berechnung eingehender dargelegt, während für die Hordeinhydrolyse, die ganz in der gleichen Weise ausgeführt wurde, lediglich die Analysenprotokolle angegeben seien.

3 g Bynin wurden in einem tarierten Kolben mit 60 ccm 20%iger Salzsäure am Rückflußkühler gekocht. Nach 20stündiger Hydrolyse wurde eine Probe von 2 ccm entnommen, auf 10 ccm gebracht und in 2 ccm nach van Slyke der Amidstickstoffgehalt bestimmt. In 2 ccm der entnommenen Hydrolysenprobe waren 0,00849 g Amidstickstoff enthalten. Was die Technik dieser Amidstickstoffbestimmungen anbelangt, so verfuhren wir immer derart, daß wir 5 Minuten die Reaktion ruhig vor sich gehen ließen und dann die 6. Minute andauernd schüttelten. Auf solche Weise werden sehr gleichmäßige Resultate erhalten. Auf alle Fälle ist zu empfehlen, sich mit reinen Substanzen, z. B. Alanin oder Leucin, in der Handhabung der Apparatur zuerst zu üben und erst, wenn man mit diesen die theoretischen Ausbeuten an Stickstoff erhält, zur eigentlichen Analyse überzugehen. Auch kann nicht genug, besonders in der jetzigen Zeit, betont werden, auf die Reinheit der verwendeten Reagenzien zu achten. So konnte unser angeblich reines Natriumnitrit erst nach zweimaliger Umkrystallisierung brauchbar werden, und nach langem Suchen konnten wir einen befriedigenden Eisessig finden.

Nach Tarieren des Kolbens wurde weiter hydrolysiert und nach insgesamt 26- und 28stündiger Hydrolyse Proben von 2 ccm entnommen und unter Berücksichtigung kleiner Kon-

zentrationsverschiedenheiten während der fortgesetzten Hydrolyse

nach 26 Stunden in 2 ccm 0,009 24 g Amidstickstoff
und nach 28 Stunden in 2 ccm 0,009 30 g „

gefunden. Damit konnte die Hydrolyse als vollendet betrachtet werden. Eine unvollständige Hydrolyse kann, wie Osborne zeigte, leicht zu Fehlern Anlaß geben.

Die Lösung des hydrolysierten Eiweißes wurde in einem doppelhalsigen Kolben im Vakuum vom größten Teil der Salzsäure befreit, mit warmem Wasser aufgenommen und in einen 200 ccm-Meßkolben übergeführt. Je 20 ccm dieser Lösung wurden nach Kjeldahl verbrannt und lieferten 0,036 96 bzw. 0,036 69 g N, also im Mittel 0,3682 g N in 200 ccm. Diese Zahl für den Totalstickstoff in unserer Lösung dient als Grundlage und Kontrolle für alle weiteren Arbeiten und Berechnungen.

150 ccm der Lösung wurden sodann weiter verarbeitet und zunächst das Ammoniak bestimmt. Um Arginin und Cystin vor der Zersetzung zu bewahren, wird die Ammoniakbestimmung vorsichtig durch Destillation unter vermindertem Druck und Zugabe von Kalkmilch ausgeführt. 150 ccm der Lösung wurden auf 200 ccm verdünnt, 100 ccm Alkohol, um das Schäumen zu vermeiden, zugefügt und so viel 10%ige Kalksuspension zugesetzt, bis dauernde Trübung und alkalische Reaktion bestehen blieb. Aus dem 1 l fassenden doppelhalsigen Destillierkolben wurde dann bei einer Wasserbadtemperatur von 40 bis 45° und einem Druck von 9 bis 10 mm ½ Stunde lang das Ammoniak in 80 ccm vorgelegte $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure überdestilliert unter Benützung der von van Slyke empfohlenen Vorlageanordnung. Mit alizarinsulfosaurem Natrium als Indicator wurde die überschüssige Schwefelsäure zurücktitriert. Vom Ammoniak waren verbraucht

46,41 ccm $^{n}/_{10}$-SO_4H_2 = 0,065 03 g N in 150 ccm = 0,086 70 g N in 200 ccm Originallösung.

Nach Beendigung der Ammoniakdestillation wurde der Kalk, der den Melaninstickstoff adsorbiert hatte, abfiltriert, mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion ausgewaschen und das Filter samt Niederschlag nach Kjeldahl verascht.

Es wurden verbraucht

3,38 ccm $^{n}/_{10}$-SO_4H_2 (Fakt. 97,38) = 0,004617 g N in 150 ccm = 0,00615 g Melanin N in 200 ccm Lösung.

Im Filtrat des Melaninstickstoffs wurde sodann die Fällung der Hexonbasen vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde das Filtrat samt Waschwasser zuerst im Vakuum auf etwa 100 ccm konzentriert und in einem 200 ccm-Erlenmeyerkolben mit einer 18 ccm konzentrierten Salzsäure und 15 g nach Winterstein mit Äther und Wasser gereinigter Phosphorwolframsäure enthaltenden Lösung versetzt, auf 200 ccm verdünnt und durch Erwärmen am Wasserbad die Fällung wieder gelöst. Nach 48stündigem Stehen, um auch die Histidinausscheidung vollkommen zu machen, wird unter Verwendung einer Büchnernutsche und eines gehärteten, nach Vorschrift van Slykes hergerichteten Filters die Fällung abfiltriert und das Filter samt Niederschlag mit 150 ccm eines 2,5 % Phosphorwolframsäure und 3,5 % Salzsäure enthaltenden Waschwassers in kleinen Portionen von 10 bis 15 ccm ausgewaschen, wonach das Filtrat frei von Calcium ist.

Nach Beendigung des Auswaschens wird der Niederschlag mit starker Natronlauge, nachdem man ihn vom Filter gespritzt hat, versetzt, bis Lösung und bestehen bleibende schwache Rötung des zugegebenen Phenolphthaleins eingetreten ist. Nach sehr starker Verdünnung wird das phosphorwolframsaure Natron mit Bariumchloridlösung zu Bariumphosphorwolframat umgesetzt und letzteres auf der Nutsche abgesaugt und chloridfrei ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden im Vakuum stark konzentriert, von einer kleinen Menge sich nochmals ausgeschiedenen Bariumphosphorwolframats abfiltriert und Filtrat und Waschwasser auf ein sehr kleines Volumen im Vakuum eingeengt und mit Wasser in ein 50 ccm-Meßkölbchen gespült. In dieser Lösung wird alsdann die Trennung der Hexonbasen vorgenommen und mit der Bestimmung des Arginins begonnen. Die Bestimmung dieser Base beruht darauf, daß sie beim Kochen mit verdünnter Alkalilösung in Ornithin und Harnstoff zerfällt und letzterer quantitativ in Ammoniak zersetzt wird. Die praktische Ausführung erfolgt derart, daß man 25 ccm obiger Lösung mit 12,5 g festem Ätzkali in einem kleinen Kjeldahlkolben 6 Stunden unter Rückfluß kocht, wo-

bei man auf das Kühlerrohr eine Folinsche Kugelvorlage, die mit $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure beschickt ist, aufsetzt. Nach 6 stündigem Kochen wird dann noch in üblicher Weise wie bei der Kjeldahlbestimmung das in der Lösung enthaltene Ammoniak unter Verwendung der Schwefelsäure in der Folinschen Vorlage überdestilliert und mit alizarinsulfosaurem Natrium als Indicator zurücktitriert.

Vom Ammoniak waren gebunden worden 2,227 ccm $^{n}/_{10}$-SO_4H_2 1 ccm $^{n}/_{10}$-SO_4H_2 = 0,0056 g Argininstickstoff in der gesamten Basenlösung, also = 0,01247 g in 50 ccm Basenlösung entsprechend 150 ccm Originalhydrolysenlösung = 0,01663 g Argininstickstoff in 200 ccm Originalhydrolysenlösung.

Dieser Betrag muß noch zwei Korrekturen erfahren, einmal, weil mit dem Arginin 17 % des vorhandenen Cystins bei dieser Methode zersetzt werden und andrerseits, weil unter den angegebenen Fällungsbedingungen die Argininphosphorwolframatfällung eine gewisse kleine Löslichkeit besitzt, die von van Slyke genau bestimmt wurde.

An Cystin (siehe später) wurde gefunden 0,00339 g, davon 17 % = 0,00057 g.

Die Korrektur für die Löslichkeit der Argininphosphorwolframsäureverbindung beträgt 0,0032 g, so daß der tatsächliche Argininwert sich auf

$$\begin{array}{r} 0{,}01663 \\ -\,0{,}00057 \\ +\,0{,}0032 \\ \hline =0{,}01926\text{ g} \end{array}$$

abändert.

Nach der Bestimmung des Argininstickstoffs wird die vom Ammoniak befreite Lösung nach Kjeldahl auf den noch restierenden Stickstoff analysiert. Es wurden verbraucht 3,25 ccm $^{n}/_{10}$-SO_4H_2. Die Summe der jetzt und früher bei der Argininbestimmung verbrauchten Kubikzentimeter $^{n}/_{10}$-SO_4H_2 mit 0,0028 multipliziert liefert den Totalstickstoff der Basen, also

$$\begin{array}{r} 3{,}25 \\ +\,2{,}23 \\ \hline =5{,}48\cdot 0{,}0028 = 0{,}015344\text{ g} \end{array}$$

in 50 ccm oder 0,02046 g Total-Basenstickstoff in 200 ccm ursprünglicher Hydrolysenlösung.

Zur Bestimmung des Cystins wird der organische Schwefel dieser Verbindung in den Sulfatrest übergeführt und dieser als Bariumsulfat zur Wägung gebracht. 10 ccm unserer 50 ccm betragenden Basenlösung werden mit 5 ccm Denisscher Lösung (25 g Kupfernitrat, 10 g Ammonnitrat, 20 g Natriumchlorid auf 100 ccm) eingedampft und vorsichtig zur Rotglut erhitzt, die 10 Minuten lang eingehalten wird. Nach dem Aufnehmen mit 10%iger Salzsäure wird, wie üblich, mit Bariumchlorid der SO_4-Rest gefällt und zur Wägung gebracht. Gleichzeitig ist noch mit den Reagenzien ein blinder Versuch auszuführen und in Abzug zu bringen.

Es wurde in den angewandten 10 ccm Basenlösung gefunden

	0,0094 g $BaSO_4$
davon ab für blinden Versuch	0,0009 g $BaSO_4$
	= 0,0085 g $BaSO_4$

1 mg $BaSO_4$ = 0,3 mg Cystinstickstoff in der gesamten Basenlösung, also 0,0085 · 0,3 = 0,00255 g Cystinstickstoff in 50 ccm Basenlösung oder 0,00339 g in 200 ccm ursprünglicher Hydrolysenflüssigkeit.

Die Löslichkeit der Cystinphosphorwolframsäureverbindung ist nach van Slyke 0,0026, so daß sich der Wert von

0,00339 g auf 0,00599 g Cystinstickstoff

erhöht.

Zur Bestimmung des Histidins und des Lysins ist noch der Gehalt an Amidstickstoff in der Basenlösung notwendig. Zu diesem Zweck wurden 2 mal je 5 ccm der Basenlösung im Apparat von van Slyke mit Natriumnitrit und Eisessig ½ Stunde lang zersetzt und 1,99 bzw. 1,95 ccm, im Mittel 1,97 ccm reines Stickstoffgas bei 18,5° und 720 mm Druck gemessen. Dies entspricht abzüglich des Wertes für den blinden Versuch der Reagenzien mit 0,00097 g 0,00671 g Amidstickstoff in 50 ccm Basenlösung oder 0,008946 g in 200 ccm ursprünglicher Hydrolysenflüssigkeit.

Die Bestimmung des Histidins und Lysins erfolgt auf dem

Wege der Berechnung aus den bisher ermittelten Daten. Der Nichtaminostickstoff der Basen stammt aus dem Arginin, das $^3/_4$ seines Stickstoffs in einer Form, die nicht mit salpetriger Säure reagiert, enthält und aus dem Histidin, das $^2/_3$ seines Stickstoffs in Nichtaminoform besitzt. Deshalb muß man zur Berechnung des Histidinstickstoffs $^3/_4$ des Argininstickstoffs vom Total-Nichtaminostickstoff abziehen und die Differenz mit $^2/_3$ multiplizieren.

Ist D der gesamte Nichtaminostickstoff der Basen, also die Differenz aus Totalstickstoff und Aminostickstoff und Arg die Menge des ermittelten Argininstickstoffs, so ist

$$\text{Histidin} - \text{N} = {}^3/_2\,(\text{D} - {}^3/_4\,\text{Arg}) \text{ oder}$$
$$= 1{,}667 \cdot \text{D} - 1{,}125\,\text{Arg}$$

Der Totalstickstoff der Basen betrug . .	0,02046 g
Der Aminostickstoff „ „ „ . .	0,00895 g
Differenz-Nichtamino N — = D = . . .	0,01151 g

folglich Histidin $\text{N} = 1{,}667 \cdot 0{,}01151 - 1{,}125 \cdot 0{,}01606 =$ 0,00112 g Histidin — N.

Dieser Betrag erhöht sich wiederum um die Löslichkeitskorrektur = 0,0038 g auf 0,00492 g Histidin-N in 200 ccm Originalhydrolysenlösung.

Wir finden also in 50 ccm Basenlösung (ohne Löslichkeitskorrektur)

für Arginin	= 0,01606 g
„ Cystin	= 0,00339 g
„ Histidin	= 0,00112 g
Summe	= 0,02057 g.

Total-N analytisch gefunden = 0,02041 g, folglich ist in der Basenlösung kein Lysin vorhanden.

Das Filtrat und das Waschwasser der Basen wird mit 50%iger Natronlauge versetzt, bis die Lösung durch Kalkabscheidung schwach getrübt wird, dann wird sie durch Essigsäure wieder vorsichtig geklärt und im doppelhalsigen Destillierkolben unter vermindertem Druck bis eben zum Beginn des Auskrystallisierens eingeengt. Dann spült man in einen 200 ccm-Meßkolben über, verdünnt bis zur Marke (bei unserem Versuch wurde auf 201 ccm aufgefüllt) und bestimmt in je 30 ccm nach Kjeldahl den Gesamtstickstoff.

Es wurden gefunden

0,028 24 und 0,028 51 g im Mittel 0,028 38 g = 0,190 15 in 201 ccm oder

0,253 45 g Totalstickstoff in 200 ccm ursprünglicher Hydrolysenlösung.

Davon sind an Löslichkeitskorrekturen für

Arginin	0,0032 g
Histidin	0,0038 g
Cystin	0,0026 g
Summe	0,0096 g

abzuziehen, so daß sich der Wert auf 0,233 85 g N verringert.

Zur Bestimmung des Aminostickstoffs im Filtrat der Basen wurden 2 mal je 5 ccm mit Natriumnitrit und Eisessig 10 Minuten lang zersetzt und 7,42 und 7,46 ccm im Mittel

7,44 ccm Stickstoffgas bei 19^{0} und 715 mm Druck erhalten.

Abzüglich 0,000 796 g blinden Versuch der Reagenzien entspricht dies 0,003 601 5 g Amidstickstoff,

oder in 201 ccm = 0,144 78 g oder 0,193 04 g in 200 ccm ursprünglicher Hydrolysenlösung.

An Löslichkeitskorrekturen sind

für	Arginin	0,0008 g	Amid-N
„	Cystin	0,0026 g	„
„	Histidin	0,0013 g	„
	Summe	0,0047 g	Amid-N

in Abzug zu bringen,

also 0,193 04 — 0,0047 = 0,188 34 g Amidstickstoff im Filtrat der Basen.

Der Nichtaminostickstoff des Filtrates bildet sich demgemäß aus der Differenz

0,233 85 g	Gesamt-N	im	Filtrat	der	Basen
— 0,188 34 g	Amino-N	„	„	„	„
= 0,045 51 g	Nichtamino-N	im	Filtrat	der	Basen.

Die Werte für die einzelnen Stickstoffgruppen finden sich in folgender Tabelle zusammengestellt und zugleich auf Gesamtstickstoff in Prozenten berechnet:

Ammoniakstickstoff	0,08670 g	= 23,55 %
Melaninstickstoff	0,00615 g	= 1,67 %
Cystinstickstoff	0,00599 g	= 1,63 %
Argininstickstoff	0,01926 g	= 5,23 %
Histidinstickstoff	0,00492 g	= 1,09 %
Amino-N im Filtrat der Basen	0,19304 g	= 52,43 %
Nichtamino-N im Filtrat der Basen	0,04561 g	= 12,39 %
Summe	0,36167 g	= 97,99 %

Durch direkte analytische Bestimmung wurde 0,3682 g Gesamtstickstoff gefunden.

Unter Zugrundelegung eines Stickstoffgehalts von 16,26 % im Bynin findet man

Arginin	2,89 g
Histidin	0,71 g
Cystin	2,48 g

in 100 g Bynin.

Ganz in der gleichen Weise, wie eben für das Bynin beschrieben, wurden auch 3 g Hordein einer 28stündigen Hydrolyse mit 20%iger Salzsäure unterworfen. Wir beschränken uns diesmal nur auf Angabe der analytischen Befunde.

Das Hydrolysengemisch wurde auf ein Volumen von 200 ccm gebracht, nachdem es von überschüssiger Salzsäure befreit war.

In je 20 ccm wurde der Gesamtstickstoff nach Kieldahl bestimmt und gefunden 30,20 und 29,90 ccm $^n/_{10}$-SO_4H_2 (F = 97,38) = im Mittel 0,4100 g N in 200 ccm.

Weiterverarbeitet wurden 150 ccm, die also 0,3075 g Totalstickstoff enthielten.

Bei der Destillation des Ammoniakstickstoffs wurden gebunden 51,84 ccm $^n/_{10}$-SO_4H_2 = 0,0707 g N in 150 ccm = 23,00 Prozent des Gesamt-N.

Melaninstickstoff gefunden 3,83 ccm $^n/_{10}$-SO_4H_2 (F = 97,38) = 0,00522 g N = 1,70 %.

Trennung der Hexonbasen.

Die Basenlösung betrug 50 ccm.

Cystinbestimmung. 5 ccm Basenlösung + 10 ccm Denissche Lösung.

Gefunden 0,0086 g $BaSO_4$
— 0,0011 g „ für blinden Versuch
= 0,0075 g $BaSO_4$

entsprechend 0,0075 · 0,3 = 0,00225 g Cystin-N
+ 0,0026 g Löslichkeitskorrektur
= 0,00485 g Cystin-N
= 1,58% des Gesamt-N.

Argininbestimmung. 25 ccm Basenlösung lieferten an Ammoniak eine 2,398 ccm $^n/_{10}$-SO_4H_2 entsprechende Menge =

2,398 · 0,0056 = 0,01343 g Arginin-N
davon ab . . 0,00038 g = 15% des Cystins
dazu . . . . . 0,0032 g Löslichkeitskorrektur
= 0,01625 g Arginin-N
= 5,00% des Gesamt-N.

Totalstickstoff der Basen. Im Rückstand von der Argininbestimmung gefunden an N eine 3,155 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 entsprechende Menge — also

Gesamt-N = 3,155 ccm $^n/_{10}$-SO_4H_2
+ 2,398 „ „
5,553 ccm $^n/_{10}$-SO_4H_2
= 5,553 · 0,0028 = 0,01555 g Total-N der Basen.

Aminostickstoff der Basen. 5 ccm Basenlösung lieferten nach van Slyke

1. 1,96 ccm N } bei 715 mm und 18°.
2. 1,94 ccm N }
Im Mittel 1,95 = 0,002108 g N
— 0,000790 g N für blinden Versuch
= 0,001318 : 2 = 0,000659
= 0,00659 g Amidstickstoff in 50 ccm Basenlösung.

Histidinberechnung.

Total-N = 0,01555 g
— Amid-N = 0,00659 g
Nichtamid-N = 0,00896 g

Histidin-N = 1,667 · 0,00896 — 1,125 · 0,01305
= 0,00026 g
+ 0,0038 g für Löslichkeitskorrektur
= 0,0041 g Histidin-N = 1,33% des Gesamt-N.

Es wurde also erhalten

an Histidin-N = 0,000 26 g
„ Arginin-N = 0,013 05 g
„ Cystin-N = 0,002 25 g

Summe = 0,015 56 g.

Durch direkte Bestimmung waren 0,015 55 g Total-N gefunden, so daß auch hier Lysin fehlen muß.

Das Filtrat der Basen lag in einem Gesamtvolumen von 200 ccm vor, entsprechend 150 ccm Originallösung.

Je 25 ccm ergaben nach Kjeldahl
19,53 bzw. 19,70 ccm $^n/_{10}$-SO_4H_2 (F = 97,38)
= im Mittel 0,026 76 g N in 25 ccm
= 0,2141 g N in 200 ccm
— 0,0096 g N für Löslichkeitskorrektur der Hexonbasen

= 0,2045 g Total-N.

Aminostickstoff im Filtrat der Basen:
Je 5 ccm lieferten
1. 8,63 ccm N bei 19°,
2. 8,60 ccm N und 720 mm
= 0,009 33 g N im Mittel
— 0,000 79 g N für blinden Versuch

= 0,008 54 g N in 5 ccm
= 0,004 27 g Amid-N in 5 ccm
= 0,1708 g Amid-N in 200 ccm
— 0,0047 g Löslichkeitskorrektur für Amid-N der Hexonbasen

= 0,1661 g Amidstickstoff im Filtrat der Basen
= 54,02 % des Gesamt-N.

Gesamt-N im Filtrat der Basen	0,2045 g
Amid-N „ „ „ „	0,1661 g
Nichtamid-N im Filtrat der Basen	0,0384 g
= 12,49 % des Total-N.	

Es mag noch nachgetragen sein, daß beide Hydrolysen die des Bynins sowohl wie die des Hordeins, ganz nach Vorschrift und ohne jeden Zwischenfall verliefen. Auch die einzelnen analytischen Operationen boten niemals Schwierigkeiten und ließen sich mit sehr großer Genauigkeit ausführen. Noch mals betont muß werden, daß man bei Ausführung der Aminostickstoffbestimmungen nach van Slyke unbedingt erst die nötige Übung erreicht haben muß, bevor man sich an die Analyse selbst begibt. In Anbetracht der feinen Unterschiede ist natürlich besonders den blinden Versuchen ein großes Augenmerk zuzuwenden, die wir immer wieder von Zeit zu

Zeit wiederholten und uns von der tadellosen Konstanz der Werte überzeugten. Die Übereinstimmung der einzelnen N-Werte für die Hexonbasen z. B. mit dem direkt ermittelten Wert ist eine hervorragende und beweist die Brauchbarkeit der Methode. Zu Zweifeln gaben mir lediglich die durch Berechnung ermittelten Histidinwerte Anlaß, da die Menge der ermittelten Histidinwerte gleich oder sogar noch eine Spur kleiner war als die Löslichkeit der Histidinphosphorwolframsäureverbindung.

Die Ergebnisse der beiden Hydrolysen sind in Tabelle I zusammengestellt. In Tabelle II wurden die Ergebnisse der von Osborne[1]) und Kleinschmitt[2]) am Hordein ausgeführten Hydrolysen, soweit sie die Hexonbasen betreffen, mit den unsern zusammen aufgeführt.

Tabelle I.

	Bynin	Hordein
Ammoniak-N	23,55	23,00
Melanin-N	1,67	1,70
Cystin-N	1,63	1,58
Arginin-N	5,23	5,00
Histidin-N	1,09	1,33
Amino-N im Filtrat der Basen	52,43	54,02
Nichtamino-N im Filtrat der Basen	12,39	12,49
Summe	97,99	99,12

Tabelle II.

Hordeinhydrolysen.

	100 g Hordein enthalten			100 g Bynin enthalten nach Lüers
	nach Osborne	nach Kleinschmitt	nach Lüers	
Cystin	nicht bestimmt	nicht bestimmt	2,48	2,28
Arginin	2,16	3,14	2,89	2,61
Histidin	1,28	0,51	0,71	0,82
Lysin	0	0	0	0

Aus Tabelle II ist ersichtlich, daß sich unsere Werte sowohl für Bynin als auch für Hordein zwischen diejenigen von Osborne und Kleinschmitt einreihen. Ferner geht daraus

[1]) Osborne und Clapp, Americ. Journ. f. Physiol. 19, 117, 1907.
[2]) Dissertation Heidelberg 1907, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 110, 1907.

hervor, daß zwischen unserm Hordein und Bynin praktisch keine Differenzen von Belang zutage treten. Noch deutlicher tritt dieser Umstand in Erscheinung, wenn wir die Tabelle I betrachten. Sämtliche Werte stimmen innerhalb der analytischen Fehlergrenzen überein, besonders, wenn man bedenkt, wie verschieden das Ausgangsmaterial (Gerstengraupen- und Malzmehl), das zur Hordein- und Bynindarstellung diente, war.

Wir kommen deshalb zu dem Schluß, daß, soweit es sich mit der von uns geübten Methode feststellen läßt, wohl zwischen Bynin und Hordein kein Unterschied besteht, der die Annahme rechtfertigen würde, daß Hordein und Bynin zwei besondere für Malz und Gerste charakteristische Eiweißkörper sind. Wir möchten vielmehr der Ansicht zuneigen, daß das Bynin ein Rest von bei der Keimung unabgebautem Hordein vorstellt. Wenn wir fernerhin die von W. Kraft (l. c.) bei der Keimung ermittelten Werte für die Abnahme des Hordeins graphisch in

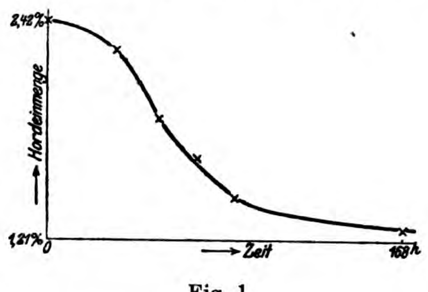


Fig. 1.

Abhängigkeit von der Zeit auftragen (Fig. 1), so erscheint uns der Kurvenverlauf ein derart regelmäßiger, anfangs sich beschleunigender, später sich wieder verzögernder, daß daraus nirgends auf die Bildung eines neuen Eiweißkörpers geschlossen werden könnte.

Zusammenfassung.

Nach der von van Slyke angegebenen Methode wurden die alkohollöslichen Proteide, Hordein der Gerste und Bynin des Malzes, einer Hydrolyse unterzogen, um einen genetischen Zusammenhang oder Unterschiede im Bau dieser beiden Eiweißkörper auffinden zu können. Die Versuche ergaben eine weitgehende Übereinstimmung in den analytischen Befunden,

die uns zur Ansicht verhalfen, daß das Bynin nicht ein neuer an die Stelle des Hordeins getretener Eiweißkörper mit anderen Eigenschaften ist, wie es Osborne erklärt, sondern daß vielmehr das Bynin ein Restteil von bei der Keimung unangegriffenem Hordein darstellen dürfte. Die Untersuchungen von Kraft über Löslichkeitsverhältnisse, Verhalten beim Pepsinverdauungsversuch, optisches Drehungsvermögen, Gehalt an Glutaminsäure dieser beiden Proteine, sowie das von Kraft bei der Keimung beobachtete äußerst regelmäßige Abnehmen des Hordeingehaltes bestätigen diese unsere Ansicht. Ihr entgegen stehen nur die Befunde Osbornes über die Elementarzusammensetzung beider Eiweißkörper, die konstant etwas voneinander differierte und auch der Anlaß zu Osbornes oben erwähnter Anschauung über die verschiedene Natur des Bynins und Hordeins waren.

Zum Schluß sei es mir gestattet, Herrn Geheimen Regierungsrat Professor Dr. Th. Paul für seine Unterstützung und sein wohlwollendes Entgegenkommen, wodurch die Ausführung dieser Arbeit ermöglicht wurde, auch an dieser Stelle meinen Dank auszusprechen.

Anwendungen der Abfangmethode auf die Bakteriengärungen. I.

Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der Vergärung von Zucker, Mannit und Glycerin durch bacterium coli, durch Erreger der Ruhr und des Gasbrandes.

Von

C. Neuberg und F. F. Nord.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie, Berlin-Dahlem.)

Nach großen Richtlinien besitzen wir einen Einblick in den Umsatz von Proteinen und Fettkörpern im Stoffwechsel der Organismen. Anders bei den Kohlenhydraten und überhaupt bei den einfacheren stickstofffreien organischen Materialien. Gerade für Verbindungen von verhältnismäßig wenig verwickeltem Bau, wie die Zuckerarten, die Milchsäure, das Glycerin und den Alkohol, die uns als häufige Produkte der Auflösung und Spaltung größerer Molekülverbände entgegentreten und wichtige Ausgangsmaterialien für weitere Umwandlungen bilden, sind bis auf wenige Fälle die Wege des Abbaus unbekannt. Die Überzeugung, daß die biochemische Verarbeitung der Kohlenhydrate und verwandten Substanzen — trotz aller Verschiedenheiten der Endprodukte — in den Hauptzügen, namentlich aber bis zu gewissen Punkten der Differenzierung gleich oder ähnlich verläuft, hat uns veranlaßt, das unlängst zum Studium der Hefengärung ausgearbeitete und mit Erfolg angewendete Abfangverfahren[1]) auf die Untersuchung bakterieller Gärungen auszudehnen.

---

[1]) C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. 78, 238, 1916. — Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 365, 1918.

Unser Abfangverfahren besteht darin, durch Zugabe eines geeigneten Bindemittels die Durchgangsstufe des Acetaldehyds wirklich festzuhalten. Das geeignete Abfangmittel liegt in den sekundären Salzen der schwefligen Säure vor. Sie haben nur eine mäßige und überwindbare Schädigung des Gärungsvorganges zur Folge und lagern das ihnen am meisten angepaßte letzte Glied in der Reihe carbonylhaltiger Zuckerspaltungsprodukte, eben den Acetaldehyd, an. Dieser wird dabei in Form des bekannten widerstandsfähigen Acetaldehyd-Sulfit-Komplexes in bedeutender Menge (bis 75% der Theorie) angehäuft und der weiteren Umwandlung durch die biologischen Agenzien entzogen. Als unmittelbare Vorstufe des Acetaldehyds muß die Brenztraubensäure gelten; denn tatsächlich läßt sich zeigen, daß sie auch in Gegenwart von Sulfit durch das in der Hefe vorhandene Ferment Carboxylase angegriffen und in Kohlensäure und die Acetaldehyd-Sulfitverbindung gespalten wird. Daß sich der Acetaldehyd anreichert und nicht eine ihm vorangehende Carbonylstufe des Kohlehydratabbaus, ist darin begründet, daß der hydrolytische Zerfall der Carbonyl-Sulfit-Komplexe bei den höher molekularen Verbindungen weit größer ist als bei dem wenig in die Komponenten gespaltenen und beständigen Acetaldehydderivat.

Die Vorstellung, die uns erfüllte, war also die, für die schon früher theoretisch abgeleitete[1]) und bei der alkoholischen Zuckerspaltung erwiesene[2]) zentrale Stellung der Brenztraubensäure bzw. des Acetaldehyds im Bereiche der Kohlenhydratumsetzungen erweiterte experimentelle Grundlagen dadurch zu schaffen, daß wir den Weg über die Aldehydstufe für verschiedene und von ganz ungleichen Erregern ausgelöste Gärungsvorgänge feststellten.

Die Durchsicht der großen Handbücher der Mykologie oder der Kunde von den pathogenen Kleinlebewesen ergibt, daß bezüglich der Frage des Auftretens von Acetaldehyd als einem Produkte bakterieller Kohlenhydratspaltungen die Angaben noch unsicherer und spärlicher lauten, als dies bis zu dem jüngst von uns erbrachten Beweise für den Ablauf der alkoholischen Gärung über die Aldehydstufe der Fall war. Abgesehen von jenen bekannten älteren, meist auf eine

[1]) C. Neuberg, Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle. Monograpie, Jena 1913.

[2]) C. Neuberg und E. Reinfurth, l. c.

sekundäre Oxydation von Alkohol sich beziehenden Beobachtungen über eine gelegentliche Bildung von Aldehyd bei der Hefengärung führt beispielsweise F. Lafar[1]) ein Vorkommen dieser Substanz an im Gärgut von Mucorarten, von Torulaceen und von Essigbakterien. In der „Allgemeinen Mikrobiologie" von W. Kruse[2]) findet sich ein Hinweis auf die Entstehung von Aldehyd bei der Milchsäure- und Essigsäuregärung. Geht man jedoch diesen und ähnlichen, offenbar immer wieder durch die Literatur geschleppten Angaben nach, so findet man an den zitierten Orten in der Originalliteratur entweder überhaupt nichts[3]) oder nichts Bestimmtes; oder man trifft, wie bei der Erwähnung Lafars hinsichtlich der Mucorgärung, auf eine Stelle, an der als ganzer Beweis für das Auftreten von Acetaldehyd folgendes angeführt wird: „Das Destillat der Milchsäuregärung, mit Silberlösung und ein wenig Ammoniak versetzt, gibt beim Erwärmen einen Silberspiegel, enthält also kleine Mengen Aldehyd [A. Fitz[4])]. Oder man begegnet, wie bei N. Passerini[5]), der Vorstellung, daß der bei der alkoholischen Gärung von Traubensaft, also durch Hefen gebildete Alkohol durch nicht genauer charakterisierte fremde Mikroorganismen sekundär oxydiert werde, wobei die gebildete Essigsäure von anderen Erregern wieder zu Aldehyd reduziert werden soll. Wir selbst haben noch einige weitere Literaturstellen aufgefunden, so eine Bemerkung von B. Gosio[6]) für Milchsäure bildende Vibrioarten, ferner Hinweise von A. Trillat und B. Sauton[7]) für Lactose zersetzende Bacterien der Milch (bac. subtilis und bac. lacti amar.), von P. Martinand[8]) für eine Torulaart sowie ferner von A. Schattenfroh und R. Graßberger[9]) für den Granulobacillus. Aber auch für diese Angaben gilt fast ausnahmslos unsere Vorbemerkung, daß der Nachweis von Aldehyd nur höchst unsicher erbracht ist und die Feststellung fehlt, welcher Aldehyd überhaupt vorliegt. Ein von E. C. Grey[10]) geprüfter Stamm des bac. coli Escherich soll aus Glucose Spuren Acetaldehyd erzeugen, aber dieses Vermögen durch Um-

---

[1]) F. Lafar, **4**, 516 bis 517; **5** 345, 448, 463, 571, 619.

[2]) W. Kruse, Allgem. Mikrobiologie, **1910**, S. 334, 430.

[3]) So bei einer Angabe von H. Pringsheim, diese Zeitschr. **8**, 129, 1908, die er bezüglich des Mucor racemosus macht und für die er die Literaturstelle, Ber. **9**, 1352, 1876 anführt, oder bei dem Zitat von Kruse (l. c., S. 428) für Kahmhefe, das auf Poggendorffs Ann. **142**, 293, 1871 verweist. An beiden Orten kommt das Wort Aldehyd nicht einmal vor.

[4]) A. Fitz, Ber. **6**, 57, 1873.

[5]) N. Passerini, Staz. sperim. agrar. ital. **39**, 221, 1906.

[6]) B. Gosio, Arch. f. Hygiene **21**, 118, 1894; **22**, 1, 1895.

[7]) A. Trillat und B. Sauton, Bull. soc. chim. [4] **3**, 162, 1908.

[8]) P. Martinand, Compt. rend. **149**, 465, 1909.

[9]) A. Schattenfroh und R. Graßberger, Arch. f. Hygiene **37**, 84, 1900.

[10]) E. C. Grey, Bioch. Journ. **7**, 359, 1913; Proc. Roy. Soc. **90**, 75, 1918.

züchtung mit Wechsel des Nährbodens verlieren. Keinesfalls ist aber die Fähigkeit zur Aldehydbildung eine allgemeine Eigenschaft der Colibacillen (s. unten). Die colorimetrisch ermittelte Aldehydmenge hatte im Höchstfalle 0,00234 g aus 15 g Zucker betragen, sich also auf 0,015% des angewendeten (bzw. 0,031% des umgesetzten) Kohlenhydrates belaufen; sie war also so minimal, daß ein überzeugender Zusammenhang mit den eigentlichen Gärungsvorgängen so wenig wie früher bei der alkoholischen Zuckerspaltung konstruiert werden konnte. In späteren Arbeiten über die Coligärung finden sich keine weiteren Belege für die Isolierung von Acetaldehyd. Dagegen wurden als Umwandlungsprodukte auch noch Bernstein- und Ameisensäure beobachtet; nach den mitgeteilten Analysen ist der zerlegte Zucker absolut vollständig in Form der erwähnten Spaltstücke wiedergefunden worden, so daß nach des Autors eigenen Zahlen gar kein Raum für den Acetaldehyd geblieben ist. In einer Studie über Eurotiopsis gayoni, einen Pilz aus der Gruppe der Aspergillaceen, hat P. Mazé[1]) die Anschauung entwickelt, daß der „ternäre Kohlenstoff" über Zucker, Alkohol und Aldehyd der lebenden Substanz einverleibt werde. Der Verf. fügt jedoch hinzu, daß er nicht zu bemerken brauche, daß der Aldehyd als Zwischenprodukt normalerweise weder im Pilzmaterial noch in der Kulturflüssigkeit zu finden ist[2]). Wo kleine Mengen auftreten, z. B. bei Züchtung des Mikroorganismus auf Milchsäurelösungen, nimmt der Autor eine sekundäre Entstehung über Alkohol, den Eurotiopsis tatsächlich aus Lactaten erzeugt, an[3]) und betont trotz der Hypothese von einer Rolle des Aldehyds im intermediären Stoffwechsel seines Pilzes besonders, daß dieser auch nicht die schwächste Aldehyddosis vertrage.

Nicht viel bestimmter lauten die Angaben für die Bildung von Acetaldehyd bei der Essigsäuregärung, von der ausführlich in der nachfolgenden Mitteilung die Rede ist.

Streng genommen gehört zwar die biochemische Bildung von Essig aus Sprit nicht in das Bereich der hier behandelten Umsetzungen von Zuckerstoffen und ihren Abkömmlingen. Allein der Äthylalkohol ist das Hauptprodukt oder ein typisches Nebenerzeugnis vieler Kohlenhydratumwandlungen, und überdies steht die Stufe des Äthylalkohols nach der Ansicht mancher Pflanzenphysiologen durch den Vorgang der anaeroben Atmung in so naher Beziehung zu den Zuckerarten, daß in weiterem Sinne die oxydative Umwandlung des Weingeistes ein Kapitel des Kohlenhydratstoffwechsels bedeutet und in diesem Zusammenhange betrachtet werden darf.

Im ganzen wird der Stand der Frage am besten wohl dadurch gekennzeichnet, daß im Inhaltsverzeichnis des neuen Lehrbuches der

---

[1]) P. Mazé, Ann. de l'Inst. Pasteur **16**, 346 u. 433, 1902; C. r. **134**, 191, 1902.

[2]) l. c. S. 378.

[3]) l. c. S. 447.

Mikrobiologie von E. Friedberger und R. Pfeiffer (1919) und von O. Emmerlings Monographie der Acetaldehyd überhaupt nicht, in Kolle-Wassermanns Handbuch der pathogenen Mikroorganismen nur als Desinfiziens erwähnt wird.

Wenn es nun möglich ist, für die einzelnen Gärungen und verwandten Vorgänge den Nachweis zu erbringen, daß sie über die Stufe des Acetaldehyds ihren Weg nehmen, so tritt als einheitlicher Gesichtspunkt für die Beurteilung dieser Erscheinungen die bedeutsame Rolle des Acetaldehyds als Abbauprodukt der stickstofffreien Substanzen hervor.

In der Tat gelingt es, durch Zusatz schwefligsaurer Salze — genau wie bei der alkoholischen Zuckerspaltung — auch bei verschiedenen bakteriellen Kohlenhydratumsetzungen die Acetaldehydstufe zu fixieren.

Da mehrfach durch die Versuchsanordnung ausdrücklich dargetan wird, daß der Vorgang anaerob erfolgt, so ist (bis auf den besonders zu behandelnden Fall der Überführung von Sprit in Essig) eine sekundäre Entstehung des Acetaldehyds etwa aus zuvor gebildetem Äthylalkohol auszuschließen, und man kann nach Analogie mit der Hefengärung annehmen, daß bei der bakteriellen Vergärung von Zucker, Mannit und Glycerin die Brenztraubensäure die unmittelbare Vorstufe des Acetaldehyds ist. Diese Schlußfolgerung erscheint um so zulässiger, als gerade neuerdings durch die Forschungen von M. W. Beijerinck und T. Folpmers[1]) sowie von P. Mazé und M. Ruot[2]) sich ergeben hat, daß durch mehrere Mikroorganismen Brenztraubensäure aus verschiedenen einfachen Substanzen, namentlich auch aus der als Zwischenprodukt des Kohlenhydratumsatzes oftmals auftretenden Milchsäure, hervorgehen kann. Diese Bildung erfolgt allerdings nur schwierig und unter bestimmten, ungünstigen Lebensbedingungen und — zum wesentlichen Unterschiede von den anaeroben Prozessen der von uns behandelten Vergärung von Zucker durch Hefen und Bakterien — unter Verbrauch von atmosphärischem Sauerstoff.

Unsere bisherigen Untersuchungen mit dem Abfangver-

---

[1]) M. W. Beijerinck und T. Folpmers, Koninkl. Akad. van Wetenschappen, Amsterdam, 18, 1198, 1916.

[2]) P. Mazé und M. Ruot, Compt. rend. Soc. Biol. 68, 706, 1916; 69, 336, 1917.

fahren, denen solche an höher entwickelten Organismen folgen sollen, erstrecken sich auf die Gärwirkungen 4 verschiedener Bakterienarten, von denen 2 zu den harmlosen, 2 zu den pathogenen Mikroben gehören. Die Erreger selbst kamen stets als Reinkulturen und zumeist in mehreren Varietäten zur Anwendung; sie wurden auf ihr Verhalten gegen verschiedene Substrate geprüft. Vorweg sei bemerkt, daß einwandfrei in allen Fällen die Abfangung des Acetaldehyds gelungen ist. Die Versuche selbst umfassen folgende Gruppen:

1. Bildung von Acetaldehyd bei Einwirkung von bacterium coli commune auf Glucose und Glycerin, und zwar sowohl in Gegenwart von Pepton als in rein mineralischer Nährlösung.

2. Bildung von Acetaldehyd durch Ruhrbacillen. Uns standen die Stämme Flexner, Y und Shiga-Kruse zur Verfügung. Sie alle lieferten Acetaldehyd bei der Kultivierung in Lösungen von Glycerin, Mannit und Maltose.

3. Bildung von Acetaldehyd durch Erreger des Gasbrandes, und zwar den Fränkelschen Bacillus. Dieser den Buttersäurebakterien nahe verwandte Anaerobier wächst auf Glucoselösungen unter Entwickelung von Acetaldehyd.

4. Bildung von Acetaldehyd bei der Einwirkung von Essigbakterien auf Äthylalkohol. Zu den Versuchen dienten hauptsächlich bacterium ascendens, ein Weinessigbildner, und bacterium pasteurianum, das zur Gruppe der Bieressigbakterien gehört. Sämtliche Varietäten kamen sowohl in Bierwürze als in Bier wie in Hefenautolysat (Hefenwasser) zur Anwendung, in denen alle gediehen.

Unsere Ergebnisse mit dem Abfangverfahren sind deshalb ganz eindeutig ausgefallen und müssen in hohem Maße als beweisend gelten, weil in den ohne Sulfitzusatz angesetzten Kontrollproben ausnahmslos[1]) kein Acetaldehyd auftrat, während er in Gegenwart geeigneter Mengen sekundärer schwefligsaurer

[1]) Bis auf Versuche mit dem bacill. dysenter. variat. Shiga-Kruse (vgl. S. 153 und 156), der auch ohne Sulfitzugabe kleine Mengen Aldehyd hervorbringt.

Salze niemals vermißt wurde. Unser Colistamm und der Gasbranderreger produzierten normalerweise keine Spur Acetaldehyd.

Um die erzielten Ausbeuten an Aldehyd richtig bewerten zu können, muß man vergleichsweise die Produkte in Betracht ziehen, die bei normalem Chemismus der erwähnten Bakterien entstehen. Derselbe ist für die beiden pathogenen Mikroorganismen, die Erreger der Ruhr und des Gasbrandes, ganz ungenügend, dagegen für die Colibacillen hinreichend bekannt.

Für das bacterium coli commune hat A. Harden[1]) gezeigt, daß die Zersetzung des Traubenzuckers ziemlich genau nach der Gleichung:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + H_2O = 2\,CH_3\cdot CHOH\cdot COOH + 2\,CO_2 + 2\,H_2 + CH_3\cdot COOH + C_2H_5OH$$

erfolgen kann. Aus 2 Molekülen Glucose geht also neben 2 Molekülen Milchsäure, 2 Molekülen Kohlensäure und 2 Molekülen Wasserstoffgas 1 Molekül Alkohol und 1 Molekül Essigsäure hervor. Durch einen experimentellen Eingriff in die Vorgänge, die dieser Gährungsgleichung zugrunde liegen, kann man eine Bildung von Acetaldehyd auf Kosten zweier Produkte, nämlich des Alkohols und der Essigsäure, erwarten[2]). Nach den genauen Untersuchungen, die wir Harden über diesen Gegenstand verdanken, entstehen in praxi die beiden Verbindungen Alkohol und Essig-

[1]) A. Harden, Journ. of Chem. Soc. 79, 610, 1901.

[2]) Es ist zu vermuten (vgl. C. Oppenheimer, Fermente II, 684, 1913), daß diese beiden Produkte durch eine Canizzarrosche Reaktion aus Acetaldehyd entstanden sind, und wir werden die obige Gleichung für die Spaltung des Traubenzuckers durch Colibacillen auch so interpretieren dürfen, daß zunächst Brenztraubensäure und Acetaldehyd auftreten. Die Gleichung nimmt dann folgende Form an:

α) $C_6H_{12}O_6 = CH_3\cdot CHOH\cdot COOH + CH_3\cdot CO\cdot COOH + H_2$;

β) $CH_3CO\cdot COOH = CH_3\cdot CHO + CO_2$;

γ) $2\,CH_3\cdot CHO + H_2O = CH_3\cdot CH_2OH + CH_3COOH$.

Die öfter betonte Ähnlichkeit zwischen Hefen- und Coligärung würde also darauf beruhen, daß auch bei letzterer der nicht in Milchsäure verwandelte Teil des umgesetzten Zuckers über Brenztraubensäure und Acetaldehyd abgebaut wird. Die in letzter Phase erfolgende Reduktion des Acetaldehyds bleibt bei der Coligärung aus, weil der hydrierende Wasserstoff in molekularem Zustande frei entwickelt wird, während zugleich der primär entstandene Acetaldehyd eine einfache Disproportionierung zu Alkohol und Essigsäure erfährt.

säure zusammen in einer Ausbeute von 22 bis 37% vom Gewichte des angewendeten Zuckers, während die Theorie 29,4% erfordert. Wir sind bis zu 12,66% Acetaldehyd vom Gewicht der angewendeten Glucose gelangt (vgl. Vers. Nr. 1, S. 149). Ein richtiges Urteil über diese Zahl gewinnt man, wenn man die gleichzeitig hervorgebrachte Alkoholmenge berücksichtigt. Es ergab sich z. B. für einen Vergleichsansatz (s. S. 152, Nr. 14), in dem aus 10 g Zucker innerhalb 14 Tagen in Peptonbouillon 1,29 g Alkohol ohne die geringste Beimengung von Aldehyd produziert waren, im Sulfitversuche (s. S. 151 u. 152, Nr. 13) eine Bildung von 0,25 g Alkohol, der von 0,10 g Acetaldehyd begleitet war. In einem anderen Vergleichsansatz (s. S. 152, Nr. 15 und 16) war unter ähnlichen Bedingungen, aber in einer Nährlösung mit rein mineralischer N-Quelle, im Kontrollversuche innerhalb 14 Tage 0,7 g Alkohol und keine Spur Aldehyd erzeugt, während in der mit Sulfit behandelten Probe neben 0,4 g Spiritus 0,18 g Acetaldehyd auftraten. 40 bis 45% vom Gewichte der entstandenen Alkoholmenge waren also als Acetaldehyd zugegen.

Es ist erst jüngst von Grey (l. c.) und schon früher von O. Emmerling[1]) sowie von H. v. Euler und H. Meyer[2]) darauf aufmerksam gemacht worden, daß die obige Gleichung Hardens für die Zersetzung des Traubenzuckers durch bact. coli einen Idealfall darstellt, indem die zahlreich bekannten Varietäten des Colibacillus die Glucose wohl in qualitativer Beziehung ungefähr gemäß jener Formulierung, aber nach anderen Zahlenwerten zerlegen. Das trifft auch für unsere Kultur, die zur Vergärung der vorhandenen Glucose etwa doppelt soviel Zeit benötigte, wie von Harden angegeben ist, insofern zu, als sie zwar in Peptonlösung die theoretische Quantität Äthylalkohol (12,9% statt 12,8%) hervorbrachte, aber in rein mineralischer Nährflüssigkeit nur etwas mehr als die Hälfte, 7,2% dieser Spritmenge, lieferte.

Der Umstand, daß die im ersten der angeführten Fälle beim Sulfitversuch erzielte Ausbeute an Alkohol + Aldehyd nicht unerheblich hinter der in der sulfitfreien Kontrolle er-

[1]) O. Emmerling, Monogr. 1902, 45.

[2]) H. v. Euler und H. Meyer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 80, 247, 1912.

reichten Spritmenge zurückbleibt, hat seine Ursache wohl darin, daß der Zusatz von schwefligsauren Salzen die Entwickelung des Erregers etwas behindert. Dabei wird aber — ganz ebenso wie bei der Spaltung des Zuckers durch Hefe in Gegenwart von Sulfit — die Alkoholproduktion nicht völlig unterdrückt, und zwar aus den Gründen, die C. Neuberg und E. Reinfurth schon früher[1]) ausführlich dargelegt haben. Die in erster Linie verantwortliche schädliche Dissoziation des Acetaldehyd-Sulfit-Komplexes wird im Fall der Coligärung noch dadurch gesteigert, daß einmal die Temperatur notwendigerweise höher gehalten werden mußte als bei der Hefengärung, dann aber dadurch, daß der ganze Vorgang nur in Gegenwart von überschüssigem kohlensauren Kalk (wegen der durch den Erreger bewirkten Säurebildung) vor sich ging. Das Calciumcarbonat wirkt aber direkt zerlegend auf die Doppelverbindung von Acetaldehyd mit schwefligsaurem Salz ein. Hinzu kommt weiterhin als ein den Zerfall des Sulfitkomplexes begünstigendes Moment der Umstand, daß durch doppelte Umsetzung der durch Säuerung entstandenen löslichen Kalksalze (Calciumlactat und Calciumacetat) mit dem als Abfangmittel vorhandenen Dinatriumsulfit das wenig lösliche schwefligsaure Calcium ausgefällt wird, so daß die tatsächlich in Lösung befindliche, der Zersetzung des Aldehyd-Sulfit-Komplexes entgegenwirkende Menge schwefligsauren Salzes erheblich verringert ist. Dasselbe trifft natürlich für die Versuchsanordnungen zu, bei denen von vornherein auf die Anwesenheit des löslichen Dinatriumsulfits verzichtet und von Anfang an festes Calciumsulfit zugegen war.

Die Benutzung des neutralen Calciumsulfits[2]) ($CaSO_3 + 2H_2O$) als Abfangmittel an Stelle des Dinatriumsulfits erwies sich als eine Erweiterung der Methode. Sie zu befolgen ist in vielen Fällen geradezu geboten infolge der Empfindlichkeit vieler Mikroorganismen gegen lösliche schwefligsaure Salze. Die Bisulfite und Pyrosulfite spalten in wäßriger Lösung die äußerst bactericide freie schweflige Säure ab und sind infolgedessen unbrauchbar. Die sekundären Sulfite der Alkalien reagieren alkalisch, und viele

[1]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 380, 1918.
[2]) C. Neuberg, Zeitschr. f. Botanik 11, 1918.

Mikroorganismen besitzen nicht die für die Hefe früher von C. Neuberg und E. Färber nachgewiesene Fähigkeit[1]), den schädigenden Einfluß der Hydroxylionen zu überwinden. Hinzu kommen die Umstände, daß auch das Sulfition an sich und überhaupt größere Mengen löslicher Salze für zahlreiche Lebewesen nicht gleichgültig sind, so daß die Konzentrationsverringerung durch Benutzung des kaum löslichen Erdalkalisulfits von wesentlichem Vorteil sein kann. Freilich vermindert sich aus den soeben dargelegten Gründen damit der quantitative Effekt der Abfangmethode; allein durch diese Abänderung ist das Verfahren auch bei weniger widerstandsfähigen Zellen verwendbar und somit allgemeiner brauchbar geworden. Eine methodische Vervollkommnung bedeutet die Heranziehung unlöslicher und neutral reagierender Sulfite für den Zweck der Abfangung ferner dadurch, daß auch solche Substrate, die gegen alkalisch reagierende sekundäre Alkalisulfite empfindlich sind, wie z. B. Glycerinaldehyd und Dioxyaceton, nunmehr in den Kreis der Untersuchungen treten können.

Geeignet ist das frisch durch doppelte Umsetzung von Na_2SO_3 mit $CaCl_2$ dargestellte und ausgewaschene Calciumsulfit, das der Formel $CaSO_3 + 2H_2O$ entspricht. Das käufliche Salz, meist die wasserfreie Verbindung $CaSO_3$, ist nicht empfehlenswert.

Die zersetzende Kraft der Colibacterien ist ausgesprochen auch gegenüber dem Glycerin. Bei der Vergärung dieser wichtigen Substanz in Gegenwart von Sulfit tritt gleichfalls Acetaldehyd in beträchtlicher Menge auf, und zwar auf Kosten von Äthylalkohol, der nach Harden (l. c.) gemäß der Gleichung

$$C_3H_8O_3 = H \cdot COOH + C_2H_5OH$$

normalerweise hervorgebracht wird.

Die Versuche lehren also, daß Glycerin auch in Anwesenheit von Sulfit durch Bacillen verändert werden kann. Dieses Verhalten bietet Interesse im Hinblick auf Wandlungen, die unter Umständen das bei der Hefengärung entstandene Glycerin beim Lagern erfährt. Die Zerlegung des Glycerins durch Mikroorganismen weist ferner darauf hin, daß die hier beschriebene bacterielle Erzeugung von Acetaldehyd (Oxydationsstufe) nicht ihr Gegenstück in der korrelativen Bildung von Glycerin (als ent-

[1]) C. Neuberg und E. Färber, l. c.

sprechender Reduktionsleistung) zu haben braucht. Der in freier Form auftretende Wasserstoff sowie die Ameisensäure, die vielleicht als Desoxydationsprodukt der Kohlensäure betrachtet werden kann, bieten genug Reduktionsäquivalente.

Bei den verschiedenen von uns geprüften Varietäten von Erregern der Ruhr haben wir uns nur auf die qualitative Ermittelung des Acetaldehyds beschränkt, da, wie vorerwähnt, der Kohlenhydratstoffwechsel dieser Bacterien in quantitativer Hinsicht ganz unerforscht ist. Sowohl bei der Züchtung auf Zucker (Maltose) als bei der Kultivierung auf mehrwertigen Alkoholen (Mannit und Glycerin) erfolgt in Gegenwart des Abfangmittels kräftige Aldehydbildung. Spuren dieses Körpers erhält man übrigens, was bisher unseres Wissens nicht bekannt war, auch in Abwesenheit von Sulfit mit dem Stamm Shiga-Kruse. Da nach unseren Versuchen die Kohlenhydratzersetzung durch die Ruhrbacillen auf dem Wege über den Acetaldehyd erfolgt, kann man wohl die Frage erwägen, ob die schweren Störungen, die diese Krankheitserreger auslösen, nicht zum Teil mit einer Produktion von Acetaldehyd zusammenhängen. Dabei braucht man nicht nur an die allgemeine Giftwirkung dieses Stoffes zu denken, sondern auch an Schädigungen, die er infolge seiner Reaktionsfähigkeit lokal verursachen könnte[1]). Erhebliche Unterschiede zwischen den drei von uns geprüften Stämmen Flexner, Y und Shiga-Kruse hinsichtlich der Stärke der Aldehydproduktion konnten wir im allgemeinen bei den Abfangversuchen nicht feststellen, wollen jedoch erwähnen, daß wir die deutlichsten Reaktionen bei dem uns zur Verfügung stehenden Stamme Shiga-Kruse beobachtet haben, der als der gefährlichste gilt.

Ein besonderes Interesse bietet das Verhalten des Gasbranderregers, des Fränkelschen Bacillus; er gehört zur Gruppe der Buttersäurebildner. Schon A. Fitz, dem Entdecker der Butylgärungen, ist es nicht entgangen, daß es sich

---

[1]) Über die toxische Wirkung im Darm entstehender Aldehyde hat F. Flury (Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 67, 321 und 390, 1912) in einer bemerkenswerten Mitteilung Angaben gemacht. Er beobachtete unter den Stoffwechselprodukten der Askariden Aldehyde. Die Natur derselben ist jedoch noch nicht festgestellt, auch die Herkunft nicht; sie können den Kohlenhydraten wie den Proteinen entstammen.

bei diesen Vorgängen um eine Synthese handelt; denn Butylalkohol, $C_4H_{10}O$, und Buttersäure, $C_4H_8O_2$, entstehen auf biochemischem Wege nicht nur aus Substanzen mit höherer Kohlenstoffanzahl, wie den Hexosen und zugehörigen Hexiten, sondern auch aus Verbindungen der C_3-Reihe, insbesondere aus Milchsäure und Glycerin. Fitz[1]) hat bereits selbst die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, daß hier der Acetaldehyd das vermittelnde Glied bilden könne, indem sein erstes Kondensationsprodukt, das Acetaldol, die viergliedrige Kohlenstoffkette aufweist. Seitdem hat die Acetaldolhypothese[2]) in mehr oder minder abgeänderter Form des öfteren als Grundlage von Betrachtungen über die Entstehung von Gärungsbutylalkohol und -buttersäure gedient, ohne daß jedoch eine experimentelle Stütze vorhanden gewesen wäre. Eine solche liefert nun unser Befund des Acetaldehyds unter den Abbauprodukten des Glucosemoleküls durch den genannten Bacillus. Weitere Versuche müssen zeigen, ob auch die nicht pathogenen Erreger der Butylgärungen sich ebenso verhalten und ob unter entsprechenden Bedingungen auch aus den Verbindungen der C_3-Reihe Acetaldehyd entsteht, was nach unseren Erfahrungen mit den Colibacterien (s. vorher) erwartet werden darf.

Übrigens ist seit längerer Zeit in der Bakteriologie ein diagnostisches Verfahren im Gebrauch, das vielleicht eine unbewußte Anwendung vom Wesen der Abfangmethode macht. Es ist dies die Züchtung von Mikroorganismen auf Fuchsin-Agar, wie ihn S. Endo[3]) im Jahre 1904 angegeben hat. Zur Bereitung dieses Nährbodens wird Fleischbrühe-Nähragar mit Milchzucker sowie mit einer alkoholischen Fuchsinlösung nebst Natriumsulfit und Soda erhitzt. Dabei wird das Fuchsin zur farblosen Leukobase reduziert. Bei der Einwirkung von Colibacillen, die den Milchzucker intensiv zersetzen, erfolgt nun Rötung des entfärbten Fuchsinagars, während sie bei solchen Bacterien ausbleibt, die den zugefügten Milchzucker nicht angreifen und sich nur auf Kosten der vorhandenen anderen Nährstoffe entwickeln. Man hat die eintretende Rötung bisher auf eine Produktion von Säuren, insbesondere von Milchsäure, bezogen auf Grund der Vorstellung, daß die Säure das vorhandene Alkali mit Beschlag belege und die Rückoxydation der Leukobase zum Rosanilin herbeiführe, dessen Lactat rot ist. Besondere

---

[1]) A. Fitz, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 9, 1351, 1876.

[2]) Vgl. insbesondere E. Buchner und J. Meisenheimer, Ber. 41, 1410, 1908.

[3]) S. Endo, Centralbl. f. Bakt., I. Abt. 35, 109, 1904.

Versuche, deren Anstellung durch die von R. Willstätter und A. Stoll[1]) angegebene Methodik ermöglicht ist, werden entscheiden können, ob es sich hier tatsächlich um regeneriertes Fuchsin oder um jenen Farbstoff saurer Natur handelt, der bekanntlich beim Zusammentritt von Fuchsin mit Aldehyd durch Kondensation gebildet wird.

Schließlich wollen wir noch darauf hinweisen, daß mit der gleichen Methode die normalerweise nicht festzustellende Acetaldehydbildung auch bei anderen Mikroorganismen, z. B. bei den Erregern der ubiquitären Fäulnis sowie der Citronensäure- und Fumarsäuregärung[2]), erwiesen werden konnte.

Die Fesselung der Acetaldehydstufe bei den Bacteriengärungen stellt auch den ersten experimentellen Beweis für die allgemeinere Rolle des Acetaldehyds als Produkt des intermediären Stoffwechsels dar. Dieses Ergebnis tritt in Beziehung zu den seit Jahren vorliegenden, aber wenig beachteten Angaben von P. Mazé[3]), A. Perrier[4]) sowie A. Harden und D. Norris[5]), daß verschiedene Mikroorganismen den Acetaldehyd als Kohlenstoffquelle ausnützen können. Damit gewinnt die Anschauung eine Berechtigung, daß der so überaus reaktionsfähige Aldehyd ein wichtiges Baumaterial der Zelle bilde, die ihn vielleicht in ähnlich vielseitiger Weise verwendet, wie die in stetiger Ausdehnung begriffene Acetylen-Industrie den Carbid-Aldehyd.

Jedenfalls eröffnet uns die Abfangmethode wertvolle Einblicke in den Stoffumsatz zahlreicher Organismen in bezug auf die Abbauwege der stickstofffreien Substanz.

---

[1]) R. Willstätter und A. Stoll, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. J. Springer, Berlin **1918**, S. 387.

[2]) Nach unveröffentlichten Versuchen von Frl. Dr. T. Hamburger, muß man bei empfindlichen Mikroorganismen insofern einen etwas anderen Weg einschlagen, als man das Sulfit erst zu der in voller Entwicklung begriffenen Kultur setzt.

[3]) P. Mazé, C. r. **134**, 240, 1902.

[4]) A. Perrier, C. r. **151**, 163, 1910.

[5]) A. Harden und D. Norris, Proc. Roy. Soc., Serie B, **84**, 492, 1912.

Experimenteller Teil.

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt worden ist, gelingt es, mit Hilfe der von C. Neuberg und E. Reinfurth[1]) genau beschriebenen Abfangmethode, die Entstehung von Acetaldehyd auch bei bacteriellen Gärungsvorgängen nachzuweisen. Die hierfür erforderliche Anwendung von sekundären schwefligsauren Salzen muß durch einige unwesentliche Änderungen den besonderen Verhältnissen angepaßt werden. Die Vergärungen wurden teils in organischer, teils in mineralischer Nährlösung in Gegenwart von Dinatriumsulfit bzw. Calciumsulfit vorgenommen. Die Arbeitsweise war hierbei im allgemeinen folgende:

Gewöhnliche Fleischbouillon wurde unter Zusatz von 1 bis 2 $^0/_0$ Pepton nach der Sterilisation im Dampfstrom in Kölbchen von meistens 100 ccm abgefüllt, die zuvor bei 180^0 sterilisiert gewesen waren. Der Kolbeninhalt wurde nunmehr 3 mal in Zwischenzeiten von 24 Stunden in strömendem Dampf, das letztemal unter Zusatz der jeweils gewählten Calciumcarbonat-[2]) und Sulfitmenge sterilisiert, nachdem vorher der zu prüfende Zucker oder höhere Alkohol darin zu 1 bis 2,5 $^0/_0$ gelöst war. Im Falle der Anwendung von Ammoniumsulfat oder von reduzierenden Zuckern wurden diese Substanzen in Wasser gesondert sterilisiert. Hiernach wurde auf Agar-Agar bzw. Bouillon mit etwa 0,25 ccm der Lösung eine Sterilitätsprobe ausgeführt und im Falle der Keimfreiheit nach weiteren 24 Stunden die Beimpfung mit einer frischen Bakterienkultur[3]) vorgenommen. Hierbei trachteten wir immer eine Mikroorganismenmenge zu übertragen, die durch eine Platinöse von etwa 1,5 mm Durchmesser und 0,2 mm Drahtstärke aufgenommen werden konnte.

Die geimpften Gäransätze wurden nunmehr in einem Brutschrank von 37^0 belassen und täglich wiederholt kräftig umgeschüttelt. Dann wurde nach 1 bzw. 3, 8, 14 bzw. 16 und

---

[1]) l. c.

[2]) $CaCO_3$ war durch trockenes Erhitzen auf 180^0 bereits von Keimen befreit.

[3]) Für die Überlassung der verschiedenen Bacterienkulturen sind wir Herrn Prof. M. Ficker zu großem Danke verpflichtet.

24 Tagen qualitativ geprüft oder der entstandene Acetaldehyd quantitativ bestimmt.

Als Grundlage der qualitativen Proben diente wie bei den Hefegärungen die Reaktion mit Nitroprussidnatrium, die den Vorteil bietet, daß sie mit dem Gärgut unmittelbar ausgeführt werden kann. Zu diesem Zwecke wurden dem Gärungsgemische etwa 3 ccm (möglichst ohne Bodensatz) steril entnommen, mit etwa 0,5 ccm einer $4^0/_0$igen Nitroprussidnatriumlösung und hiernach mit etwa 1 ccm einer $3^0/_0$igen Piperidinlösung versetzt; das Auftreten der charakteristischen Blaufärbung galt als Kriterium der Entstehung von Acetaldehyd. In einzelnen Fällen (s. Protokollauszug) wurde die Reaktion auch mit Diäthylamin angestellt oder der Acetaldehyd in Form seines p-Nitrophenylhydrazons abgeschieden.

Für eine genauere qualitative Prüfung empfiehlt es sich, von 50 ccm Gärgut 50 bis 55 ccm Wasserdampfdestillat in eine mit 5 ccm verdünntem Alkohol beschickte Vorlage überzutreiben.

Für die quantitative Bestimmung des Acetaldehyds genügt nicht die einfache Destillation des Gärgutes, sondern es ist die verlustlose Zerlegung der Aldehyd-Sulfit-Komplexverbindung erforderlich. Da der Acetaldehyd am besten titrimetrisch ermittelt wird, muß die Spaltung derartig erfolgen, daß das Destillat frei von schwefliger Säure ist. Dies erreicht man auf dem von Neuberg und Reinfurth (l. c.) angegebenen Wege und mit der von ihnen benutzten Apparatur. Dabei wird, falls die Abfangung mit Hilfe eines löslichen Sulfits geschehen ist, der nicht verbrauchte Anteil desselben zunächst durch Umsetzung mit Chlorbarium (in $25^0/_0$iger Lösung) ausgefällt, weil er der durch kohlensauren Kalk vorzunehmenden Zerlegung des Sulfitkomplexes entgegenwirken würde. Im Falle der Anwendung von kaum löslichen schwefligsauren Salzen ($CaSO_3 + 2\,H_2O$) erübrigt sich natürlich die vorherige Entfernung der verhältnismäßig wenigen in der Flüssigkeit befindlichen Sulfitionen.

Bei den kleineren Quantitäten Acetaldehyd, die hier vorliegen, ist die Beseitigung des bei der Umsetzung mit $BaCl_2$ entstandenen Bariumsulfits durch Filtration unnötig. Man kann die mit der erforderlichen Menge Chlorbarium sowie mit Calciumcarbonat versetzte Probe des Gärgutes unmittel-

bar der Destillation im Wasserdampfstrom unterwerfen; bei sorgfältiger Kühlung in dem früher beschriebenen Apparat geht dann der Acetaldehyd quantitativ in die Vorlage über. Bei den Vergärungen mittels des Erregers des Gasbrandes muß die Destillation unter gleichzeitigem Zusatz von etwas Bleiacetat vorgenommen werden, da Spuren auftretenden Schwefelwasserstoffs die Reaktion mit Nitroprussidnatrium illusorisch bzw. die Titration des Aldehyds ungenau machen würden. Diejenigen Destillate, die aus einem Gärgut mit mineralischer N-Quelle stammten, mußten meistens unter Zusatz von einigen Tropfen Schwefelsäure rektifiziert werden, da das Zusammentreffen des abgespaltenen Ammoniaks mit der Kupferseele der Kühlvorrichtung eine schwächere oder stärkere Blaufärbung des Destillates verursachte.

In zwei aliquoten Teilen des Destillates wurde nunmehr der Acetaldehyd nach der bekannten Methode von Ripper-v. Fürth in Doppelbestimmungen ermittelt.

Jeder Versuchsreihe war ein sulfitfreier Ansatz als Kontrollversuch angeschlossen.

Auszug aus den Protokollen.

A. Versuche mit B. coli comm.[1])

Die Ansätze der

ersten Versuchsreihe (Nr. 1 bis 4)

enthielten:

je 100 ccm Wasser,
2,0 g Glucose,
1,0 g Pepton.

Zugesetzt wurden:

bei Nr. 1 1 g Calciumcarbonat + 2 g Natriumsulfit[2]),
" " 2 1 g " + 4 g Calciumsulfit [2]),
" " 3 1 g " + 2 g " ,
" " 4 1 g " ; kein Sulfit (Kontrolle).

---

[1]) Der Stamm war aus Menschenstuhl isoliert und im Laboratorium von Herrn Geheimrat M. Ficker weitergezüchtet.

[2]) Die angegebenen Sulfitmengen bedeuten hier und im folgenden stets die in der angewendeten Substanz vorhandenen Mengen wasserfreies und reines Salz (Na_2SO_3 bzw. $CaSO_3$).

Zur quantitativen Bestimmung des Acetaldehyds wurde bei Versuch Nr. 1

die Wasserdampfdestillation der gesamten Urlösung nach 10 Tagen unter Zusatz von 20 ccm Bariumchloridlösung von 25 % + 10 g Calciumcarbonat vorgenommen. Sie ergab:

440 ccm Destillat, enthaltend 0,2532 g Aldehyd.

Bei Nr. 2 und 3 erübrigte sich die Anwendung von $BaCl_2$; die Destillation erfolgte unter alleiniger Zugabe von 10 g kohlensaurem Kalk. Es gingen über:

bei Nr. 2 . . . . 0,0352 g Aldehyd,
„ „ 3 . . . . 0,0373 g „ ,
„ „ 4 (ohne Zusatz abgeblasen) 0,0000 g „ .

Die Bestandteile der Ansätze in der

zweiten Versuchsreihe (Nr. 5 bis 9)

waren:

je 100 ccm Wasser,
2,0 g Glucose,
0,7 g Ammoniumsulfat.

Hinzugefügt wurden:

bei Nr. 5 1 g Calciumcarbonat + 2 g Natriumsulfit,
„ „ 6 1 g „ + 1 g „ ,
„ „ 7 1 g „ + 4 g Calciumsulfit,
„ „ 8 1 g „ + 2 g „ ,
„ „ 9 1 g „ ; kein Sulfit (Kontrolle).

Die Wasserdampfdestillation der gesamten Urlösung wurde nach 10 Tagen unter Zugabe von $CaCO_3$ und nötigenfalls (s. vorher) von $BaCl_2$ ausgeführt. Sie lieferte bei der quantitativen Ermittelung

für Nr. 5 . . . . . 0,0045 g Aldehyd,
„ „ 6 . . . . . 0,0014 g „ ,
„ „ 7 . . . . . 0,0040 g „ ,
„ „ 8 . . . . . 0,0055 g „ ,
„ „ 9 . . . . . 0,0000 g „ .

Der Vergleich der Ergebnisse beider Versuchsreihen ergibt, daß in Anwesenheit von mehr Calciumsulfit weniger Aldehyd fixiert wurde. Im ganzen scheint die Nährlösung mit organischer N-Quelle für die Aldehydbildung etwas günstiger zu sein

als die mit Ammonsulfat bereitete; in letzterer setzte übrigens mit unserem Colistamm die regelmäßige Gasentwickelung am frühesten ein.

Ansätze der

dritten Versuchsreihe (Nr. 10 bis 12).

Nr. 10 und 11 enthielten

je 500 ccm Wasser und

10 g Glucose

in Gegenwart von 5 g Calciumcarbonat + 10 g Calciumsulfit und 5 g Pepton (Nr. 10) bzw. 3,5 g Ammoniumsulfat (Nr. 11).

Im Ansatz Nr. 12 waren zugegen:

1000 ccm Wasser,

25 g Glycerin,

10 g Pepton,

10 g Calciumcarbonat + 8 g Dinatriumsulfit.

Die Nitroprussidnatriumprobe mit dem Gärgut direkt war bei

Nr.	nach 1 Tage	nach 3 Tagen	nach 4 Tagen	nach 6 Tagen
10	schwach	schwach	kräftig	kräftig
11	negativ	schwach	deutlich	stark
12	negativ	negativ	schwach	deutlich.

Die quantitative Acetaldehydbestimmung ergab für die Gesamtmenge nach der Dampfdestillation von je 100 ccm Urlösung, wobei 300 bis 360 ccm übergetrieben wurden,

für Nr.	Aldehyd nach 10 Tagen	Aldehyd nach 16 Tagen	Aldehyd nach 24 Tagen
10	0,1075 g	0,120 g	(verloren gegangen)
11	0,152 g	0,1615 g	0,9875 g
12	0,2435 g	0,386 g	0,731 g.

Die Ansätze der

vierten Versuchsreihe (Nr. 13 bis 18)

waren denen der dritten Reihe (Nr. 10 bis 12) gleich, jedoch durch je einen weiteren Parallelansatz (Nr. 14, 16 und 18) für die Ermittelung des in Abwesenheit von Sulfit, also auch von Acetaldehyd, entstandenen Alkohols ergänzt; die Ansätze Nr. 13,

14, 17 und 18 enthielten Pepton, Nr. 15 und 16 Ammoniumsulfat als N-Quelle. Am 14. Tage wurde die quantitative Aldehydbestimmung ausgeführt, nachdem qualitative Prüfungen am 7. und 12. Tage vorangegangen waren.

Die Probe mit Nitroprussidnatrium war bei:

Nr.	nach 7 Tagen	nach 12 Tagen
13	kräftig	kräftig
14	negativ	negativ
15	schwach	positiv
16	negativ	negativ
17	"	stark positiv
18	"	negativ.

Die in gewohnter Weise mit je 50 ccm Urlösung vorgenommene Aldehydbestimmung ergab nach 14 Tagen für die Gesamtmenge, die 10 g Glucose in Nr. 13 bis 16 sowie 10 g Glycerin in Nr. 17 und 18 enthalten hatte:

Bei Ansatz Nr. 13	0,101 g Aldehyd,
" " " 14	0,000 g " ,
" " " 15	0,181 g " ,
" " " 16	0,000 g " ,
" " " 17	0,243 g " ,
" " " 18	0,000 g " .

Die Bestimmung der gebildeten Alkoholmenge erfolgte gleichfalls nach 14 Tagen; dafür wurden jedesmal 400 ccm dem Gärgut (Gesamtquantum 500 ccm) entnommen und davon zunächst 250 ccm abdestilliert, die wegen eines geringen Gehaltes an Ammoniak nochmals aus saurer Lösung übergetrieben wurden. Infolge der Anwesenheit kleiner Mengen flüchtiger Fettsäuren wurde dann über Pottasche rektifiziert. Das schließlich erhaltene Destillat von 100 ccm wurde mit viermal soviel m-Phenylendiaminchlorhydrat[1]) wie dem festgestellten Acetaldehyd entspricht, 1 Stunde lang am Rückflußkühler gekocht, so vom Aldehyd befreit und nachher staffelweise auf 15,0 ccm gebracht. In dieser Endlösung des gereinigten Alkohols wurde nunmehr die Spritmenge pyknometrisch ermittelt. Bei den Kontrollen (d. h. in den sulfitfreien Ansätzen, in denen kein

[1]) Das Verfahren wird demnächst von C. Neuberg und J. Hirsch beschrieben werden.

Aldehyd aufgetreten war), unterblieb selbstverständlich die Behandlung mit salzsaurem m-Phenylendiamin. Gefunden wurden bei Ansatz

Nr.	Alkohol in g bezogen auf die Gesamturlösung (500 ccm)
13	0,2493
14	1,2908
15	0,3940
16	0,7170
17	1,0575
18	1,4493.

Der von uns benutzte Stamm von B. coli comm. erzeugte, wie die angeführten und zahlreiche weiter vorgenommenen Kontrollen lehren, normalerweise keine Spur Acetaldehyd weder aus Traubenzucker noch aus Glycerin. Der bei der Zersetzung dieser beiden Substanzen intermediär entstehende Acetaldehyd, der für gewöhnlich die zuvor angegebenen Umwandlungen erfährt und sich also nicht anhäufen kann, läßt sich aber genau so sicher wie der Acetaldehyd der Hefengärung durch sekundäre schwefligsaure Salze festlegen. Seine Bildung steht in deutlicher Abhängigkeit von dem Teil der Vorgänge, der normalerweise die Alkoholproduktion veranlaßt.

B. Versuche mit den Ruhrbacillen.

Von den Erregern der Ruhr standen uns die 3 Stämme Flexner, Y und Shiga-Kruse zur Verfügung. Zur Anwendung gelangte

bei den Ansätzen 1 bis 12 der Stamm Flexner.

Die Ansätze 1 bis 4 hatten folgende Zusammensetzung:

Auf je 50 ccm Bouillon mit 2 % Pepton + 0,75 g Mannit kamen:

bei 1.	1 g	Calciumcarbonat	+ 0,5 g	Natriumsulfit,
„ 2.	1 g	„	+ 1,0 g	Calciumsulfit,
„ 3.	1,5 g	„	+ 1,5 g	„ ,
„ 4.	1 g	„ .		

Die unmittelbare qualitative Prüfung mit 3 ccm der Urlösung ergab nach 24 Stunden folgende Abstufungen für die Probe mit Nitroprussidnatrium

bei 1. rosa,
" 2. unsicher,
" 3. positiv,
" 4. negativ.

Nach 72 stündigem Stehen wurde die Reaktion mit Nitroprussidnatrium auch mit dem Wasserdampfdestillat (50 ccm aus 50 ccm Gärgut) angestellt; sie war

bei 1.	sehr stark positiv,
" 2.	schwächer als 1,
" 3.	" als 2,
" 4.	spurenhaft.

Die Ansätze 5 bis 8 erhielten auf

je 100 ccm Bouillon mit 2 % Pepton + 1,5 g Glycerin einen Zusatz

bei 5. von 2,0 g Calciumcarbonat + 1,0 g Natriumsulfit,
" 6. " 2,0 g " + 2,0 g Calciumsulfit,
" 7. " 3,0 g " + 3,0 g " ,
" 8. " 2,0 g " .

Je 50 ccm der Urlösung wurden nach 5 bzw. 9 Tagen in üblicher Weise mit Wasserdampf destilliert, bis 50 ccm übergegangen waren; die Proben nach Rimini verhielten sich dann folgendermaßen:

Nr.	nach 5 Tagen	nach 9 Tagen
bei 5.	Spur	schwach positiv
" 6.	negativ	Spur
" 7.	deutlich positiv	"
" 8.	Spur	schwach positiv.

Bei den Ansätzen 9 bis 12 entfielen

auf je 50 ccm Bouillon mit 2 % Pepton + 0,75 g Maltose
für 9. 1,0 g Calciumcarbonat + 0,5 g Natriumsulfit,
" 10. 1,0 g " + 1,0 g Calciumsulfit,
" 11. 1,5 g " + 1,5 g " ,
" 12. 1,0 g " .

Die unmittelbare Prüfung von 3 ccm Urlösung ergab für die Ansätze 9, 10 und 11 nach 24 bzw. 48 Stunden im ersten Falle schwache Verfärbungen, im zweiten positive Reaktionen.

Die Untersuchung des Ansatzes 12 lieferte beide Male ein negatives Resultat.

Die Restmenge des Gärgutes wurde nach 5 Tagen mit Wasserdampf behandelt. Im Destillate (je 50 ccm) war die Reaktion mit Nitroprussidnatrium

bei 9. stark positiv (auch die Reaktion mit fuchsinschwefl. Säure),
„ 10. positiv,
„ 11. stark positiv (ebenfalls mit Diäthylamin statt Piperidin),
„ 12. negativ.

Bei den

Ansätzen 13 bis 24 gelangte der Stamm Y

zur Anwendung. Hier waren angestellt
je 100 ccm Bouillon mit 1 % Pepton + 1,5 g Mannit (Versuch 13 bis 16),
„ 100 „ „ „ 1 % „ + 1,5 g Maltose (Versuch 17 bis 20),
„ 100 „ „ „ 1 % „ + 1,5 g Glycerin (Versuch 21 bis 24).

Zugefügt wurden
bei 13., 17., 21.: 2 g Calciumcarbonat + 1 g Natriumsulfit,
„ 14., 18., 22.: 2 g „ + 2 g Calciumsulfit,
„ 15., 19., 23.: 2 g „ + 3 g „ ,
„ 16., 20., 24.: 2 g „ .

Nach 3 Tagen wurde die erste Destillation von je 50 ccm der Urlösung vorgenommen. Der Ausfall der einzelnen Proben mit Nitroprussidnatrium ist in nachstehender Tabelle wiedergegeben:

Nr.	nach 72 Stunden
bei 13.	stark positiv (auch Reaktion mit fuchsinschwefl. Säure)
„ 14.	} positiv
„ 15.	
„ 16.	sehr schwach
„ 17.	positiv
„ 18.	schwach
„ 19.	negativ
„ 20.	„
„ 21.	schwach
„ 22.	„
„ 23.	„
„ 24.	in Verlust geraten.

Nach 5 Tagen erfolgte mit weiteren 50 ccm Kulturflüssigkeit abermals eine Destillation; bei der Prüfung nach Rimini waren die Reaktionen:

bei 13.	sehr stark positiv	das abgeschiedene p-Nitrophenylhydrazon schmolz nach zweimaligem Umkrystallisieren bei 128°.
„ 14.	schwach	
„ 15.	schwach	
„ 16.	negativ	
„ 17.	kräftig	die Menge des isolierten p-Nitrophenylhydrazons war etwas geringer als bei 13.
„ 18.	schwach	
„ 19.	schwach	
„ 20.	negativ	
„ 21.	schwach	
„ 22.	stärker	
„ 23.	Spur	
„ 24.	Hauch.	

Die mit dem Stamm Shiga-Kruse (original) beimpften

Ansätze 25 bis 36

hatten jeweils die gleiche Zusammensetzung wie die soeben beschriebenen (Nr. 13 bis 24), bis auf den Unterschied, daß der Peptongehalt der Fleischbouillon auf 2% bemessen war.

Der Ausfall der Nitroprussidnatriumprobe mit den Destillaten der 72 Stunden bzw. 9 Tage alten Kulturen war wie folgt:

Nr.	nach 3 Tagen	nach 9 Tagen
bei 25.	minimal	schwach
„ 26.	schwach	sehr stark positiv
„ 27.	schwächer	sehr stark positiv
„ 28.	negativ	Spur
„ 29.	deutlich positiv	deutlich positiv
„ 30.	negativ	schwach positiv
„ 31.	negativ	schwächer als 30
„ 32.	negativ	Spur
„ 33.	Spur	deutlich positiv
„ 34.	negativ	schwach
„ 35.	Hauch	„
„ 36.	„	„ .

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß im allgemeinen der Nachweis einer kräftigen Acetaldehydbildung bei den Ruhrbacillen am besten in solchen Ansätzen erbracht werden konnte, in denen der entstandene Aldehyd durch Dinatrium-

sulfit gebunden war. Eine Entstehung von sehr kleinen Mengen Acetaldehyd war auch in einigen Kontrollversuchen (bei Nr. 4, 32 und 36) zu beobachten.

C. Versuche mit dem Erreger des Gasbrandes.

Die Abfangmethode konnte mit Erfolg auch auf die Untersuchung der Stoffwechselprodukte des Gasbranderregers ausgedehnt werden. Benutzt wurde der Fränkelsche Bacillus, der zum Unterschiede von den anderen herangezogenen Mikroorganismen ein ausgesprochener Anaerobier ist. Die Vergärung des Traubenzuckers durch diesen Bacillus geschah in Kulturflüssigkeiten von ähnlicher Zusammenstellung wie für den B. coli comm. bzw. für die Erreger der Ruhr.

Zu je 150 ccm Bouillon mit 1 % Pepton und 3 g Traubenzucker wurden gefügt

bei 1. 3 g Calciumcarbonat + 1,5 g Natriumsulfit,
„ 2. 3 g „ + 10 g Calciumsulfit,
„ 3. 3 g „ + 20 g „ ,
„ 4. 3 g „ .

Jeder Ansatz wurde außerdem mit einer dicken Schicht von Paraffinum liquid. übergossen und im Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Diese Versuche verliefen anaerob.

Die erste Wasserdampfdestillation von 75 ccm Urlösung geschah in der beschriebenen Weise, jedoch unter Zufügung von etwas Bleiacetat, erstmalig nach 10 Tagen; die zweite wurde mit 50 ccm Gärgut nach 20 Tagen ausgeführt und ergab, jeweils auf die Gesamtmenge der Urlösung bezogen,

bei Nr.	Aldehyd nach 10 Tagen	Aldehyd nach 20 Tagen
1.	0,017 g	0,075 g
2.	0,013 g	0,228 g
3.	0,004 g	0,161 g
4.	0,000 g	0,000 g.

Im Gegensatz zu dem Verhalten der Ruhrbacillen gelingt allem Anscheine nach bei dem Erreger des Gasbrandes die Festlegung der Aldehydstufe besser in Gegenwart von Calciumsulfit als mittels Natriumsulfit. In allen Fällen wiesen die Er-

gebnisse eine merkliche Steigerung der Acetaldehydbildung in der Zeit vom 10. bis zum 20. Tage auf.

Dabei zeigte sich — ebenso wie zuvor bei der Versuchen mit B. coli comm. —, daß eine überreichliche Zugabe von Calciumsulfit eine schwächere Aldehydanhäufung zur Folge hat, als ein geringeres Quantum des Abfangmittels. Offenbar erleiden diese Mikroorganismen durch das schwefligsaure Natrium und durch viel Calciumsulfit eine Schädigung. Man darf auch nicht vergessen, daß durch den chemischen Vorgang der Aldehydfesselung freies Alkali, ein heftiges Gift für viele Zellen, entsteht, gemäß den Gleichungen:

a) $CH_3 \cdot CHO + Na_2SO_3 + H_2O = CH_3 \cdot CHOH \cdot SO_2Na + NaOH,$

b) $2\,CH_3 \cdot CHO + 2\,CaSO_3 + 2\,H_2O = (CH_3 \cdot CHOH \cdot SO_2)_2\,Ca + Ca\,(OH)_2.$

Im Verlaufe der Gärungen wird das gebildete Ätzalkali wohl durch die entwickelten Säuren neutralisiert; wir wissen jedoch nichts über die zeitlichen Beziehungen der einzelnen Teilreaktionen, insbesondere nichts darüber, ob die Produktion von Acetaldehyd und Säuren synchron geschieht.

Im ganzen muß es als wunderbar gelten, daß die Abfangung des Acetaldehyds überhaupt gelingt; ist sie doch an eine Umsetzung geknüpft, die in die natürlichen Milieuverhältnisse erheblich eingreift.

Anwendungen der Abfangmethode auf die Bakteriengärungen. II.

Festlegung der Aldehydstufe bei der Essiggärung.

Von

C. Neuberg und F. F. Nord.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie, Berlin-Dahlem.)

Scheinbar zu den einfachsten biologischen Reaktionen gehört die Umwandlung des Äthylalkohols in Essigsäure, die von einer großen Zahl weitverbreiteter Mikroorganismen in der Natur besorgt wird. So vielfach und eingehend diese Essiggärung auch untersucht ist, so unvollständig sind unsere Einblicke in das eigentliche Wesen dieses Vorganges. Zwar hat schon im Jahre 1835 Liebig[1]) im Hinblick auf die rein chemischen Erfahrungen bei der Oxydation von Äthylalkohol, wie sie durch den bekannten Versuch Döbereiners eingeleitet waren, die Frage aufgeworfen, ob auch die biologische Oxydation den gleichen Weg einschlage. Nachdem aber sodann namentlich unter dem Einflusse L. Pasteurs[2]), der den 1837 geäußerten Anschauungen von Friedrich Traugott Kützing[3]) zum Siege verhalf, allmählich die Auffassung der Essigbildner als leblose Katalysatoren verlassen und der ganze Vorgang nunmehr als ein Stoffwechselprozeß angesehen wurde, ist auch die Frage nach einem intermediären Produkt zwischen dem Ausgangsmaterial, dem Weingeist, und dem Enderzeugnis, der Essig

---

[1]) J. v. Liebig, Ann. **14**, 166, 1835; **21**, 113, 1837; **30**, 144, 1839.

[2]) L. Pasteur, Comp. rend. **48**, 337, 1859. Études sur le vinaigre, Paris **1868**.

[3]) F. T. Kützing, J. f. pr. Chem. **11**, 385, 1837.

säure, auf eine andere Grundlage gestellt worden. Man hat es aber, wohl in Anbetracht der Einfachheit der Reaktion, nur ganz ausnahmsweise und nebenher für nötig gehalten, die Möglichkeiten, wie dabei der Alkohol zu Essigsäure oxydiert wird, zum Gegenstande besonderer Erwägungen zu machen.

Dementsprechend tragen auch diesem Gesichtspunkte jene Bemerkungen kaum Rechnung, die vereinzelt in der Literatur über ein Auftreten kleinster Mengen von Aldehyd im Gärungsessig verzeichnet sind.

Die erste diesbezügliche Angabe aus neuerer Zeit rührt unseres Wissens von D. P. Hoyer[1]) her; bei Gelegenheit von Versuchen zur Aufklärung des Defizits zwischen der berechneten und gefundenen Essigausbeute macht dieser Autor die Äußerung: „Daß Aldehyd entsteht, habe ich folgendermaßen bewiesen: Bier und etwas Alkohol, gänzlich frei von Aldehyd, wurde in einen Kolben gebracht, worauf ein aufsteigender Kühler gestellt war, stets ganz mit Eis umgeben; die Flüssigkeit wurde nun infiziert mit bacterium rancens var. zythi und das Ganze in einen Raum gestellt, in dem die Temperatur etwa 25° war. Nach 4 Tagen war eine Haut gebildet. Die Flüssigkeit wurde nun destilliert und das Destillat in einer von schwefliger Säure entfärbten Fuchsinlösung aufgefangen. Die Lösung war schwach, aber deutlich gefärbt. Auch diese Quantität ist so gering, daß sie nicht Hauptursache des mangelhaften Ertrages an Essigsäure sein kann."

Auf Grund dieses unbefriedigenden Ergebnisses verwirft demnach Hoyer die auf Liebigs Vorstellungen zurückgehende Ansicht, daß die Verluste im Betriebe der Essigerzeugung auf Verdunstung von intermediär entstandenem Acetaldehyd beruhen könnten. Die ablehnende Stellung nehmen auch alle späteren Autoren (bis auf Hassack, s. u.) ein; fast allgemein werden jetzt jene Ausfälle auf die Verflüchtigung von Alkohol und Essigsäure selbst oder auf physiologische Verbrennung der letzteren infolge Überoxydation zurückgeführt.

Hinsichtlich eines Vorkommens von Aldehyd in verschiedenen Essigsorten liegen noch Literaturzitate von C. Böttinger[2]), P. Hassack[3]), Fr. Rothenbach[4]), G. Bredemann[5]), K. Farnsteiner[6]) sowie von J. Brode und W. Lange[7]) vor.

---

[1]) D. P. Hoyer, Die deutsche Essigindustrie **3**, 122, 1899.

[2]) C. Böttinger, Chem. Zeitg. **24**, 793, 1900.

[3]) P. Hassack, Gärungsessig, Wien u. Leipzig **1904**, 201 u. 231.

[4]) Fr. Rothenbach, Die deutsche Essigindustrie **6**, 59, 1902; **9**, 218, 1905.

[5]) G. Bredemann, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, 2. Abtlg. **22**, 86, 1909.

[6]) K. Farnsteiner, Z. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel **15**, 321, 1908.

[7]) J. Brode und W. Lange, Arb. des Kaiserl. Gesundheitsamts **30**, 24, **1909**; Beitr. z. Neubearbeitung d. Reichsvereinbarungen **1911**, I, 158.

Böttinger bezieht die beim Überschichten einer Lösung von Pyrogallol oder Resorcin in konz. Schwefelsäure mit Gärungsessig sich einstellende Gelbfärbung und spätere Rotbraunfärbung auf Aldehyd. Da diese Reaktion auch mit dem Abdampfrückstande von Essig positiv ausfällt, kann sie nicht auf Acetaldehyd beruhen. Sie kommt übrigens allen Aldehyden und ebenfalls Ketonen zu; ein solches, das Acetylmethylcarbinol (s. S. 167), ist ein Bestandteil des Essigs. Als eine Ursache von Betriebsschwierigkeiten und Störungen der Essiggärung betrachtet P. Hassack den Eintritt von Aldehydbildung. Der Aldehyd soll hauptsächlich mit den Abgasen entweichen, doch führt der Autor an, daß ihm „nur eine einzige und nicht ganz zuverlässige Analyse von Abzugsgasen aus solchen (d. h. gestörten) Essigbildnern vorliegt, in welcher N, O, CO_2, Alkohol und Aldehydgase namhaft gemacht werden". Von einem Gehalt von 0,5 % Aldehyd in der Maische an soll Gärungshemmung erfolgen. Bei erheblichen Beeinträchtigungen der Fabrikation kann nach Fr. Rothenbach gelegentlich wohl etwas Aldehyd erscheinen. Aber dieser erfahrene Kenner des Gebietes hält den Wert des Nachweises von Aldehyd für zweifelhaft, da er aus den Ausgangsmaterialien, insbesondere dem Lufthefensprit, stammen kann, und er äußert sich ferner folgendermaßen: „Die Aldehydbildung in normalen Schnellessigbildnern ist so gering, daß wir sie selbst mit unseren chemischen Reagenzien nicht ohne weiteres nachweisen können; . . . die Aldehydbildung ist aber nicht als eine eigentliche Zwischenstufe bei der Säurebildung auf dem Wege der Gärung anzusehen." Nach einem Versuche Rothenbachs muß man auch annehmen, daß die Essigbakterien einmal angehäuften Aldehyd kaum weiter verarbeiten können. Denn zugesetzter Aldehyd hielt sich 10 bis 12 Tage im Găransatz und blieb ebenso lange im ablaufenden Essig nachweisbar. Bredemanns Beobachtung über das Auftreten von Spuren unbekannter Aldehyde (?) bei der vom bacillus asterosporus bewirkten Essigsäuregärung betrifft einen Vorgang beim Abbau von Zucker, nicht die Oxydation von Weingeist. Die öfter Farnsteiner zugeschriebene Angabe eines Vorkommens aldehydähnlicher Stoffe im Essig bezieht sich in Wirklichkeit nicht auf Acetaldehyd, sondern auf das von diesem Autor im Essig aufgefundene Acetylmethylcarbinol $CH_3 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_3$. Brode und Langes Angaben enthalten keine eigentliche Äußerung zu dieser Frage; die Autoren erwähnen nebenher, daß die zur Essigfabrikation dienenden Ausgangsmaterialien, Sprit und Wein, Aldehyd enthalten können. Den Verhältnissen Rechnung tragend, erwähnt J. König[1]) bei Besprechung der analytisch nachweisbaren Bestandteile des Essigs den Acetaldehyd überhaupt nicht und nimmt nur auf das Acethylmethylcarbinol Rücksicht.

Man sieht, daß es sich in den erwähnten Fällen nach Angabe der Autoren selbst nur um bedeutungslose Spuren gehandelt

[1]) J. König, Chemie der menschl. Nahrungs- u. Genußmittel III 3, 464, 1918.

haben kann, die keine Rolle als Zwischenstufe bei der biologischen Essigbildung spielen, sondern höchstens als Produkt einer nebenherlaufenden unspezifischen Oxydation des Alkohols gelten durften. Eine solche rein chemische Bildungsweise von Aldehyd ist ja bekanntlich von A. Trillat[1]) beim Zusammentreffen von verdünnten Alkohollösungen mit Kupfer und porösen Körpern in Gegenwart von Luft festgestellt, wobei nach Mathieu[2]) das Licht auch eine Rolle spielen kann. Soweit Wein zur Essigbereitung dient, ist natürlich mit dem erwiesenen Aldehydgehalt dieses Ausgangsmaterials zu rechnen. Dasselbe gilt für den Lufthefenspiritus (Destillat aus Lufthefemaischen), worauf Rothenbach (l. c.) und H. Witte[3]) aufmerksam gemacht haben. Auch ein Aldehydgehalt der ungereinigten Carbid-Essigsäure dürfte in Betracht zu ziehen sein, nachdem neuerdings dieses Material zur Herstellung der erforderlichen sauren Reaktion in den Bildnern verwendet wird. Vor allem ist aber die Natur der betreffenden Substanz im Essig überhaupt nicht festgestellt; auf jede andere homologe Verbindung[4]), aber auch auf das Acetylmethylcarbinol (s. S. 167), das im Essig vorkommt, würde die Beschreibung fast ebenso gut passen. Die vor mehr als 80 Jahren einmal aufgeworfene Frage ist also bis heute unentschieden.

Von einem vertieften Gesichtspunkte aus hat sie in jüngerer Zeit bei seinen bedeutungsvollen Untersuchungen über die Oxydationsvorgänge H. Wieland[5]) gestreift. Ihm ist bekanntlich der Nachweis gelungen, daß die Dehydrierung des Alkohols in Gegenwart eines geeigneten Wasserstoffakzeptors, wie Methylenblau oder Chinon, auch unter völligem Ausschluß von Sauerstoff zu Essigsäure möglich ist. Bei der hier eingeschlagenen Versuchsanordnung häuft sich freilich kein Acetaldehyd an; daß aber die Aldehydstufe durchlaufen wird, darf man dem Umstande entnehmen, daß der Acetaldehyd unter denselben Bedingungen wie der Weingeist zu Essigsäure dehydriert werden kann.

---

[1]) A. Trillat, Compt. rend. **136**, 171, 1903.

[2]) Mathieu, Bull. de l'assoc. des chim. de sucr. etc. 22, 1238, 1905.

[3]) H. Witte, in K. v. Buchka „Das Lebensmittelgewerbe“ **1**, 246, 1914.

[4]) Nach E. Voisenet (Compt. rend. **150**, 40, 1910) kommen kleine Mengen Formaldehyd im Essig vor.

[5]) H. Wieland, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **46**, 3336, 1913.

Mit Hilfe unserer Abfangmethode konnten wir nun feststellen, daß sich tatsächlich bei der Essiggärung das Zwischenglied zwischen Sprit und Essig festhalten läßt. Der experimentellen Durchführung stehen bedeutende Schwierigkeiten entgegen, die in folgendem gelegen sind: Die Essiggärung ist ein Vorgang, der in ausgesprochener Weise in einem sauren Milieu verläuft. Alle Autoren sind sich in der Angabe einig, daß durch Zusatz einer Säure, am besten von fertiger Essigsäure selbst, die geeigneten Kulturbedingungen für die Essigbildner geschaffen werden müssen. Die als Abfangmittel in Betracht kommenden sekundären Salze der schwefligen Säure reagieren nun aber alkalisch, wie die Dialkalisulfite, oder neutral, wie die schwefligsauren Erdalkalien.

Saure Salze der schwefligen Säure bzw. Pyrosulfite oder, was auf dasselbe herauskommen würde, sekundäre Sulfite in Gegenwart einer fremden Säure anzuwenden, verbietet sich durch die ganz erhebliche Giftigkeit der freien schwefligen Säure für die Erreger der Essiggärung. Man sorgt zweckmäßig sogar noch durch einen besonderen Zusatz von kohlensaurem Kalk dafür, daß jede durch Säuerung sich einstellende Acidität, also SO_2-Entwicklung, sofort unschädlich gemacht wird. Denn die Empfindlichkeit der Essigbildner gegen schweflige Säure ist so ausgesprochen, daß sie als eine fast spezifische Eigenschaft dieser Mikroorganismen überall in der Literatur verzeichnet ist und daß selbst in kurz gefaßten Darstellungen des Gebietes dieses Verhaltens als Charakteristikum hervorgehoben wird; ist doch die schweflige Säure das souveräne Mittel im Gärungsgewerbe, den unerwünschten Essigstich alkoholischer Flüssigkeiten zu vermeiden.

Hinzu kommt als weitere Schwierigkeit der Umstand, daß die typischen Essigbakterien ausgesprochene Aerobier sind, d. h. nur bei ausgiebiger Luftzufuhr den Alkohol in Essigsäure umwandeln. Duclaux[1]) hat berechnet, daß die Essigbakterien in 36 Stunden bis zum 500fachen ihres Körpergewichtes an Sauerstoff verbrauchen, und H. Wüstenfeld und Th. Foehr[2]) ver-

---

[1]) Mikrobiol. 4, 216.

[2]) H. Wüstenfeld und Th. Foehr, Die deutsche Essigindustrie 16 115, 1912.

dankt man den Nachweis, daß der tatsächliche Luftbedarf das 4fache des theoretischen beträgt (und zwar im Mittel der von ihnen mitgeteilten 26 Gasanalysen). Dementsprechend erfolgt bei dem älteren Orléansverfahren und in noch höherem Maße bei der modernen Schnellessigfabrikation die Einwirkung der Mikroorganismen auf den Sprit unter energischer Lüftung. Ein solches Vorgehen verbot sich aber bei Anwendung des Abfangverfahrens einfach aus dem Grunde, weil die Sulfite sauerstoffempfindlich sind und bei hinreichendem Luftzutritt infolge Oxydation ihre Bindungsfähigkeit verlieren. Also mußte die Einrichtung der eigentlich erforderlichen Ventilation ausscheiden, und es konnte eine Zufuhr nur von so viel Sauerstoff zugelassen werden, wie allmählich durch den Wattebauschverschluß der Kulturkölbchen (konische Gefäße) hindurch aus der atmosphärischen Luft auf dem Wege der Diffusion mit den Bakterien in Berührung tritt.

Trotz der ausgesprochenen Nichterfüllung aller optimalen Bedingungen führt wunderbarerweise das Abfangverfahren zum Ziele. Da die Essigbakterien untereinander nicht unerhebliche Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit gegen Zusätze, der Ansprüche an das gebotene Nahrungsmaterial sowie im Umfange der Essigerzeugung aufweisen, benötigten wir für die Anstellung unserer Versuche unter den erwähnten ungünstigen Verhältnissen kräftige Erreger. Wir fanden zwei ausgezeichnet geeignete Essigbildner im bacterium ascendens und bacterium pasteurianum. Sie gehören zwei verschiedenen Gruppen an, indem die ersterwähnte Rasse zu den Weinessigbakterien, die zweite zu den Bieressigbakterien zählt. Wir erhielten die außerordentlich wirksamen Kulturen [1] durch die Güte des Herrn Prof. Henneberg vom Institut für Gärungsgewerbe in Berlin und des Herrn Geheimrat Maaßen

[1]) Bei einigen anderen Rassen befriedigten die Ergebnisse weniger; wir haben jedoch keinen Wert darauf gelegt, die günstigsten Bedingungen hier ausfindig zu machen, da bact. ascendens und bact. pasteurianum uns vollauf genügten. Es handelt sich gewiß nicht um prinzipielle Unterschiede, sondern es machen sich unter den abnormen Versuchsbedingungen die ungleiche Widerstandsfähigkeit und die wechselnden Anforderungen der einzelnen Essigerzeuger an das Nährsubstrat geltend.

von der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwissenschaft in Dahlem; beiden Herren möchten wir auch an dieser Stelle unseren Dank bezeugen.

Die treffliche Wirksamkeit der beiden Arten von Essigbildnern geht daraus hervor, daß — selbst unter den ungewohnten Bedingungen der Vergärung in Gegenwart von kohlensaurem Kalk — der zugesetzte Alkohol in etwa 20 Tagen bis zu rund 90% in Essigsäure übergeführt wurde, was in quantitativer Hinsicht den besten Leistungen unter normalen Verhältnissen gleichkommt. Beide Bakterienarten gediehen sowohl auf Hefewasser als auf ungehopfter Bierwürze; auf letzterer war bei unserer Anordnung das Essigsäureproduktionsvermögen größer.

Aus den im experimentellen Teil wiedergegebenen Daten geht nun hervor, daß der Zusatz des Abfangmittels eine erhebliche Bildung von Acetaldehyd auf Kosten der Essigsäure zur Folge hat. Genau wie bei der Fixierung des Acetaldehyds als Zwischenstufe der alkoholischen Zuckerspaltung wird er auch bei der Essiggärung nicht in freiem Zustande, sondern als Sulfitverbindung angehäuft. Ihn unter diesen Bedingungen quantitativ zu bestimmen, ermöglicht die jüngst hierfür ausgearbeitete genaue Methode[1]). Es ergibt sich, daß die Festlegung des Acetaldehyds in Gegenwart von Calciumsulfit weit besser als bei Gegenwart von Natriumsulfit gelungen ist. Die Gründe dafür sind offenbar darin gelegen, daß das stark alkalisch reagierende Alkalisalz der schwefligen Säure die Entwicklung der Erreger hemmt, und daß die aus ihm bei der Reaktion

$$CH_3 \cdot CHO + Na_2SO_3 + H_2O = NaOH + CH_3 \cdot CH(OH)O \cdot SO_2Na$$

frei werdende Natronlauge (!) der Anhäufung von Acetaldehyd in Form des Sulfitkomplexes stark entgegenwirkt. Diese Schädigungen sind geringer bei Verwendung des schwefligsauren Kalks. Derselbe leistete in unseren Ansätzen am meisten, wenn zu 9 ccm absolutem Äthylalkohol auf 300 ccm Kulturflüssigkeit

---

[1]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. **89**, 389, 1918.

45 g wasserfreies Calciumsulfit neben 18 g kohlensaurem Kalk zur Anwendung gelangten.

Die größte Essigsäuremenge, die wir unter diesen Bedingungen, d. h. bei gleichzeitiger Anwesenheit von kohlensaurem und schwefligsaurem Kalk, erzielten, war 2,64 g Essigsäure (aus 7,2 g Alkohol), neben denen 0,45 g Acetaldehyd auf der Höhe des Versuchs entstanden waren (Versuch 6). Dieses mit dem bact. pasteurianum auf Bierwürze erhaltene Resultat liefert also das Ergebnis, daß rund der 6. Teil der gesamten Essigmenge an Acetaldehyd isoliert wurde. Noch ein günstigeres Verhältnis zwischen beiden Substanzen — bei allerdings geringeren absoluten Werten — fanden wir bei der Kultur desselben Erregers auf Hefewasser; hier (Versuch 2) entfiel unter gleichen Bedingungen auf 1,09 g Essigsäure 0,31 g Aldehyd, also nahezu der dritte Teil.

Beim bacterium ascendens sind wir (auf Bierwürze) in Versuch 15 zu 0,67 g Acetaldehyd, also auf mehr als $^1/_3$ der im Höchstfalle überhaupt gebildeten Essigsäuremenge (1,98 g) an Acetaldehyd gelangt. Auf Hefewasser war auch hier ein noch reichlicheres Ergebnis (aber wiederum bei kleinerer tatsächlicher Ausbeute) zu verzeichnen: in Versuch 10 waren auf 0,83 g Essigsäure mehr als $^3/_4$ des Gewichtes, nämlich 0,635 g Aldehyd entstanden. Wir wollen auch nicht unerwähnt lassen, daß in Abwesenheit von kohlensaurem Kalk, d. h. nur bei Gegenwart von schwefligsaurem Calcium, die Aldehydbildung ebenfalls konstatiert worden ist.

Die Ergebnisse müssen um so höher bewertet werden, als außer den erwähnten vielen schädlichen Faktoren als weiteres ungünstiges Moment der Umstand hinzutritt, daß im Gegensatz zur Hefengärung und den Vorgängen beim bakteriellen Abbau der Kohlenhydrate im Falle der Alkoholoxydation an sich keine Kohlensäure entwickelt wird, welche das bei der Reaktion zwischen Acetaldehyd und sekundärem Sulfit frei werdende Alkali (Natronlauge oder Calciumhydroxyd) zu neutralisieren oder abzuschwächen vermag. Denn eine Kohlendioxydproduktion setzt höchstens in geringem Umfange dann ein, wenn die Essigbakterien mangels anderer Nährstoffe ihr eigenes Erzeugnis angreifen. Die allmählich sich einstellende Essigsäure bewirkt

dann wohl eine Abstumpfung des Ätzalkalis. Der zumeist beobachtete Rückgang[1]) des einmal gebildeten Acetaldehyds (zwischen dem 10. und 20. Tage) mag mit der durch diese Verhältnisse gesteigerten Dissoziation der Sulfitkomplexverbindung sowie daraus sich ergebenden sekundären Veränderungen des abgespaltenen Acetaldehyds zusammenhängen. Daß die Essigbildung nicht vollkommen zugunsten der Entstehung von Acetaldehyd unterdrückt werden kann, hat prinzipiell die gleichen Gründe, wie sie früher für den Umstand dargelegt wurden, daß auch bei der Zuckerspaltung durch Hefe in Gegenwart des aldehydabfangenden schwefligsauren Salzes die Alkoholproduktion nicht gänzlich versiegt. Denn die Bindung des Acetaldehyds kann nur gemäß einem Gleichgewichte erfolgen, das im Falle der Essiggärung weitgehend nach der Seite der Dissoziation verschoben wird und somit einen Teil des Acetaldehyds für den normalen Vorgang, die weitere oxydative Umwandlung, zur Verfügung stellt.

Nachdem jetzt die Acetaldehydbildung bei der Essiggärung bewiesen ist, gewinnen auch die vor Jahren von dem einen[2]) von uns ausgesprochenen Anschauungen über die natürliche Herkunft des Acetylmethylcarbinols, $CH_3 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_3$, an Wahrscheinlichkeit. Dieser gelegentlich im Gärungsessig, dann auch in anderen bakteriellen Erzeugnissen aufgefundene Stoff dürfte entstehungsgemäß mit dem Acetaldehyd verknüpft sein, man mag nun seine Bildung auf eine Benzoinkondensation des Acetaldehyds zurückführen oder auf eine Ketisierung zuvor gebildeten Aldols. Wir wollen bemerken, daß nach uns die gleiche Hypothese über die Entstehung dieses Körpers auch A. Fernbach und M. Schoen[3]) geäußert haben.

Das Acetylmethylcarbinol ist im Jahre 1903 von C. A. Browne[4]) im Apfelweinessig (Cider) aufgefunden und dann in mehreren Essigsorten von K. Farnsteiner (l. c.) beobachtet worden. Sein Vorkommen im Weinessig hat J. Pastureau[5]) dargetan. Es tritt in der beträchtlichen

---

[1]) Eine Wiederabnahme des bereits gebildeten Aldehyds mit der Zeit haben wir mehrfach als ein charakteristisches Vorkommnis festgestellt.

[2]) C. Neuberg in C. Oppenheimers Handb. d. Biochem. **1**, 224, 1909; C. Neuberg, Die Gärungsvorgänge und der Zuckerumsatz der Zelle, S. 41. Jena 1913; vergl. auch A. Harden und D. Norris (1912).

[3]) Annales de l'Inst. Pasteur 28, 709, 1914.

[4]) C. A. Browne jr., Ch. C. **1903**, I, 675; **1906**, I, 1795.

[5]) J. Pastureau, Ch. C. **1908**, I, 756.

Menge von 0,3 bis 0,5% auf und hat wegen seiner reduzierenden und sonstigen Eigenschaften wohl oft Veranlassung zur Verwechslung mit Aldehyd gegeben.

Daß der Aldehyd, dessen reichliche Bildung durch die Zugabe von schwefligsauren Salzen erzwungen wird, tatsächlich Acetaldehyd ist, haben wir dadurch sichergestellt, daß wir die aus der Sulfitdoppelverbindung durch Destillation mit kohlensaurem Kalk abgeschiedene Substanz in das charakteristische p-Nitrophenylhydrazon überführten. Alle speziellen Proben auf Acetaldehyd fielen positiv aus.

Die fortschreitende Entwicklung des Acetaldehyds unter dem Einflusse der zugefügten schwefligsauren Salze kann man unmittelbar im Gärgut mittels der Nitroprussidnatriumreaktion verfolgen. Dieselbe ist unter den obwaltenden Verhältnissen durchaus beweisend. (Alle Körper, mit denen die Probe sonst noch positiv ausfällt [wie Propionaldehyd, Aldol, Crotonaldehyd, Acrolein[1]) und Brenztraubensäure], sind durch die Kontrolle mit p-Nitrophenylhydrazin und anderweitig ausgeschlossen.)

Die nunmehr festgestellte Bildung einer so bedeutenden Menge Acetaldehyd neben der Essigsäure rechtfertigt den Schluß, daß die biochemische Umwandlung des Sprits bei der Essiggärung auch normalerweise über die Stufe des Acetaldehyds vor sich geht. Mit Hilfe der Abfangmethode kann man auch hier das Zwischenglied festlegen.

Experimenteller Teil.

Die Durchführung der Versuche zur Fesselung der Aldehydstufe bei der Essiggärung erforderte insofern eine geringfügige äußerliche Änderung der grundsätzlichen Versuchsanordnung, als wir wegen der zu regulierenden Sauerstoffaufnahme der Essigbacterien während des Gärvorganges (s. vorher S. 162/163) für eine verhältnismäßig große Oberfläche der Kulturflüssigkeit

---

[1]) Diese Verbindung, die bestimmte Bacterien aus Glycerin erzeugen (E. Voisenet, Compt. rend. **153**, 898, 1911), wird durch Essigbildner nicht hervorgebracht (Lafar **5**, 580, 1914).

sorgen mußten. Dieser Bedingung konnten wir am besten durch die Verwendung von konischen Kolben entsprechen, die bei einer Bodenfläche von etwa 40 qcm mit steil ausgebildeter Seitenwand nur eine Höhe von ungefähr 10 cm (ohne Tubus) erreichen. Dem Bestreben der Bacterien, sich als dünne Haut über die Oberfläche der Nährlösung auszubreiten, war somit unter den einzuhaltenden Bedingungen eines beschränkten Sauerstoffzutrittes am besten Rechnung getragen.

Im allgemeinen haben wir unsere Versuche im Sinne der nachstehenden Angaben durchgeführt:

Die jeweils trocken (bei 180^0) sterilisierten Kolben wurden in den Vorversuchen mit 100 ccm gewöhnlichem Bier und in den Hauptversuchen mit 150 bis 300 ccm ungehopfter Bierwürze oder Hefewasser (Autolysat) — letzteres mit Wasser im Verhältnis 1 : 1 verdünnt — beschickt und zunächst zweimal in Zwischenzeiten von 24 Stunden ohne jede Beigabe 20 bis 30 Minuten lang im strömenden Dampf sterilisiert. Hierauf wurden die festen Zusätze (Calciumcarbonat und Sulfit) gemacht und jeder Kolben abermals $^1/_2$ Stunde im Dampftopf sterilisiert. Nach erfolgter Abkühlung wurden 9 ccm abs. Alkohol zugefügt und die Ansätze mit der in Aussicht genommenen Bacterienart beimpft. Die mit einem sterilen Wattestopfen verschlossenen Gefäße wurden nach einmaligem kräftigen Umschütteln in einem Brutschrank bei 28 bis 29^0 sich selbst überlassen. Ein wiederholtes Umschwenken der Ansätze zu Beginn der Gärung verbot sich aus dem einfachen Grunde, weil hierdurch die Entwicklung der „Essighaut“ gestört worden wäre. Später wurde täglich einmal der Bodensatz aufgerührt. Die einsetzende und fortschreitende Bildung von Acetaldehyd wurde sodann durch die qualitative Prüfung mit Nitroprussidnatrium und Piperidin an wenigen Kubikzentimetern der Kulturflüssigkeit in fortlaufenden Zwischenzeiten festgestellt.

Zur quantitativen Bestimmung des fixierten Aldehyds verfuhren wir in der früher beschriebenen Weise (s. S. 147). Abgemessene Mengen der Kulturflüssigkeit wurden nach 10 oder 12 sowie nach 19 bzw. 20 Tagen stets in Gegenwart von Calciumcarbonat und im Falle der Anwesenheit von Natriumsulfit unter Zusatz einer äquivalenten Menge Chlor-

bariumlösung[1]) mit Wasserdampf so lange destilliert, bis die qualitative Aldehydprobe negativ ausfiel. Die Titration erfolgte sodann nach der Methode von Ripper-v. Fürth.

Die Ermittelung der entstandenen Essigsäuremenge geschah in bekannter Weise durch Titration der mit Wasserdampf aus der angesäuerten Flüssigkeit übergetriebenen Substanz. Hierbei ist zunächst eine Behandlung mit Barytwasser einzuschalten, um die in Lösung befindliche kleine Menge Calciumsulfit in das praktisch ganz unlösliche schwefligsaure Barium überzuführen. Der Niederschlag desselben ist durch Filtration zu entfernen, weil er bei der nachfolgenden Ansäuerung mit Schwefelsäure sonst schweflige Säure ins Destillat entsenden würde. (Vor der Titration stellten wir jeweils die Abwesenheit von schwefliger Säure durch Einengen von 200 ccm des mit Natronlauge alkalisierten Destillates und nachherige Oxydation mit Bromwasser usw. fest.) Bei jeder Versuchsreihe wurde ein Kontrollversuch ohne Sulfit, aber in Gegenwart von Calciumcarbonat vorgenommen, um das Essigsäurebildungsvermögen des betreffenden Erregers unter den ungewohnten Verhältnissen der Vergärung bei neutraler Reaktion kennen zu lernen.

Auszüge aus den Protokollen.

I. Vorversuche mit bacterium orléanense und bacterium ascendens in Abwesenheit von Calciumcarbonat.

Die Ansätze (a bis d) bestanden in beiden Fällen aus je 100 ccm Bier und 5 ccm absolutem Alkohol in Gegenwart (Nr. a und c) bzw. Abwesenheit (Nr. b und d) von 3 g Calciumsulfit. Die qualitativen Aldehydproben ergaben folgende Abstufungen:

Bacterium orléanense.

Nr.	nach Tagen					Bemerkung
	1	6	14	16	27	
a	0	Hauch	Hauch	Spur	schwach	mit Sulfit
b	0	0	0	0	0	ohne " .

[1]) Dieselbe bewirkt die Umwandlung des alkalisch reagierenden Dinatriumsulfits in unlöslichen schwefligsauren Baryt.

Bacterium ascendens.

Nr.	nach Tagen 1	6	14	27	36	Bemerkung
c	deutlich	kräftig	stark positiv	sehr stark	positiv	mit Sulfit
d	0	0	0	0	0	ohne „ .

Durch die quantitative Aldehydbestimmung wurde nach 36 Tagen bei Ansatz c

0,202 g Acetaldehyd

festgestellt.

II. Versuche mit Bacterium pasteurianum.

Die Zusammensetzung der Ansätze (1 bis 4) war: je 300 ccm Hefeautolysat (mit H_2O im Verhältnis 1 : 1 verdünnt) und 9 ccm abs. Alkohol.

Zugesetzt wurden

bei Nr. 1: 18 g Calciumcarbonat,
„ „ 2: 18 g „ + 45 g Calciumsulfit,
„ „ 3: 18 g „ + 75 g „ ,
„ „ 4: 18 g „ + 9 g Dinatriumsulfit.

Die quantitative Aldehydbestimmung ergab bei der Destillation[1]) von je 100 ccm Urlösung für die Gesamtmenge der Kulturflüssigkeit bei:

Ansatz Nr.	Aldehyd nach 10 Tagen g	nach 20 Tagen g
1	0	0
2	0,312	0,165
3	0,247	0,111
4	0,080	0 .

Die Essigsäureermittelungen führten zu folgendem Gesamtgehalt bei:

[1]) Die übergetriebene Flüssigkeitsmenge belief sich je nach der Quantität des Aldehyds auf 130 bis 700 ccm.

Ansatz Nr.	Essigsäure	
	nach 10 Tagen g	nach 20 Tagen g
1	7,74	8,17
2	1,09	1,01
3	1,20	1,35
4	0,30	0,43.

Die nach 4 Tagen vorgenommene qualitative Prüfung auf Acetaldehyd war bei Nr. 2 und 3 kräftig, bei Nr. 1 und 4 negativ gewesen.

Die Essighaut entwickelte sich bei den Ansätzen Nr. 1 bis 3 sehr gut, bei Nr. 4 schwächer. — Die Flüssigkeit reagierte bei Nr. 1 kaum alkalisch, Nr. 2 und 3 neutral und Nr. 4 stark alkalisch.

Die Ansätze der zweiten Versuchsreihe (Nr. 5 bis 8) enthielten die gleichen Bestandteile wie die der ersten Reihe, nur geschah die Züchtung auf 300 ccm ungehopfter Bierwürze statt auf Hefenautolysat. Die Ergebnisse der Aldehydbestimmung betrugen bei:

Ansatz Nr.	Aldehyd	
	nach 10 Tagen g	nach 20 Tagen g
5	0	0
6	0,448	0,174
7	0,221	0,030
8	0	0 ;

ferner wurden erhalten bei:

Ansatz Nr.	Essigsäure	
	nach 10 Tagen g	nach 20 Tagen g
5	8,64	8,93
6	2,64	2,65
7	2,21	2,21
8	(verloren gegangen)	0,52.

Die nach 4 Tagen vorgenommene qualitative Prüfung auf Acetaldehyd hatte bei den Ansätzen Nr. 5 und 8 ein negatives Resultat, bei dem Ansatz Nr. 6 eine schwache und bei dem Ansatz Nr. 7 eine kräftige Reaktion aufgewiesen.

III. Versuche mit bacterium ascendens.

Die Ansätze beider Versuchsreihen (Nr. 9 bis 12 sowie Nr. 13 bis 16) waren die gleichen wie bei den Versuchen Nr. 1 bis 4 bzw. Nr. 5 bis 8 mit dem bacterium pasteurianum. Die Zusammenstellung der Befunde ergibt folgendes Bild:

a) auf Hefenwasser

Aldehydwerte:

Ansatz Nr.	Aldehyd nach 12 Tagen g	Aldehyd nach 19 Tagen g
9	0	0
10	0,635	0,491
11	0,532	0,357
12	0	0,032.

Essigsäurewerte:

Ansatz Nr.	Essigsäure nach 12 Tagen g	Essigsäure nach 19 Tagen g
9	4,92	5,27
10	0,83	1,15
11	0,72	1,45
12	nicht bestimmt	0,37.

b) Auf ungehopfter Bierwürze

Aldehydwerte:

Ansatz Nr.	Aldehyd nach 12 Tagen g	Aldehyd nach 19 Tagen g
13	0	0
14	0,623	0,181
15	0,668	0,330
16	0	0,019.

Essigsäurewerte:

Ansatz Nr.	Essigsäure nach 12 Tagen g	nach 19 Tagen g
13	8,07	8,17
14	1,59	2,16
15	1,98	2,16
16	nicht bestimmt	0,43.

Abscheidung des Acetaldehyds als p-Nitrophenylhydrazon.

In zwei Ansätzen, in denen auf je 300 ccm ungehopfter Würze 9 ccm absoluter Alkohol in Gegenwart von 18 g kohlensaurem Kalk und 45 g Calciumsulfit einmal mit bacterium ascendens, das andere Mal mit bacterium pasteurianum vergoren waren, wurde der Acetaldehyd als p-Nitrophenylhydrazon abgeschieden. Zu diesem Zwecke wurde jeder der Ansätze nach 14 Tagen verarbeitet. Die Gärung war in beiden Fällen sehr lebhaft verlaufen; etwa vom 5. Tage ab entwichen dauernd Kohlensäurebläschen, die durch Einwirkung der Essigsäure auf den kohlensauren Kalk entstanden. Zur Freimachung des Acetaldehyds aus der Sulfit-Komplexverbindung wurde jedesmal das ganze Gärgut unter Zugabe von 50 g kohlensaurem Kalk destilliert. Auf Zusatz von überschüssigem p-Nitrophenylhydrazinacetat erstarrte die übergegangene Flüssigkeit sofort zu einem eigelben Brei des charakteristischen Aldehydderivates.

Erhalten wurden aus dem Ansatz mit bacterium ascendens 1,6 g, in dem mit bacterium pasteurianum 1,8 g Hydrazon.

Dieselbe war in beiden Fällen nach Schmelzpunkt und Zusammensetzung sofort rein.

p-Nitrophenylhydrazon aus Vers. mit bac. asc. N = 23,52 %
(0,1552 g Substanz gaben 32,1 ccm N bei 21° und 763 mm);
p-Nitrophenylhydrazon aus Vers. mit bac. past. N = 23,38 %
(0,1172 g Substanz gaben 24,1 ccm N bei 21° und 763 mm).

Ber. für $C_8H_9N_3O_2$: 23,46 % N.

Der Ausdehnung der Abfangmethode auf den Vorgang der Essiggärung ist ein voller Erfolg beschieden gewesen, namentlich in der Modifikation, die auf Benutzung des Calciumsulfits (an Stelle von sekundärem schwefligsauren Natrium) beruht. Die Anwendung dieses Abfangmittels als Bodenkörper ermöglicht die Benutzung des Verfahrens auch bei aeroben Prozessen. Trotz der unvermeidlichen Ungunst der durch die Versuchsanordnung geschaffenen Verhältnisse sind wir dazu gelangt, $^1/_3$ bis $^3/_4$ vom Gewichte der unter den gegebenen Bedingungen überhaupt hervorgebrachten Essigsäure als Acetaldehyd festzulegen.

Über den Verlauf der alkoholischen Gärung bei alkalischer Reaktion. II.

Gärung mit lebender Hefe in alkalischen Lösungen.

Von

Carl Neuberg und Julius Hirsch.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

In der ersten Mitteilung über diesen Gegenstand haben C. Neuberg und E. Färber[1]) im Jahre 1916 gezeigt, daß die Vergärung von Zucker mittels Hefe auch in stark alkalischen Lösungen gelingt; an den üblichen Produkten der alkoholischen Zuckerspaltung erfolgt dabei eine bedeutsame Veränderung. Sie besteht nach den Feststellungen von Neuberg und Färber in einer ganz beträchtlichen Verschiebung in den Mengenverhältnissen der normalen Gärungsprodukte: Alkohol und Kohlensäure werden in verminderter Menge gebildet, während die für gewöhnlich als Nebenerzeugnisse auftretenden Substanzen Acetaldehyd und Glycerin eine erhebliche Steigerung erfahren und die Hauptausbeute ausmachen können. In manchen Fällen beobachteten die genannten Autoren auch etwas Trimethylenglykol; letzteres dürfte jedoch nach späteren Erfahrungen von C. Neuberg und E. Reinfurth[2]) ein sekundäres Umwandlungsprodukt des zunächst entstandenen Glycerins sein. Diese Befunde eröffneten verschiedene Möglichkeiten, experimentelle Beweise für das im Jahre 1913 von C. Neuberg

---

[1]) C. Neuberg und E. Färber, diese Zeitschr. 78, 238, 1916.

[2]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 365 und 92, 234, 1918.

und Joh. Kerb[1]) aufgestellte neue Gärungsschema zu erbringen. Dasselbe weist dem Acetaldehyd und seiner biologischen Vorstufe, der Brenztraubensäure, eine zentrale Stellung zu und erklärt die Bildung von Glycerin durch die Annahme, daß Acetaldehyd und Glycerin in einem korrelativen Verhältnis von Oxydations- und Reduktionsprodukt stehen.

Die engen Beziehungen zwischen Glycerin und Acetaldehyd bzw. Brenztraubensäure kommen zunächst in der rein zahlenmäßigen Darstellung zum Ausdruck, gemäß der ein glatter Zerfall des Hexosemoleküls in je 1 Mol Brenztraubensäure und Glycerin bzw. nach erfolgter Carboxylasespaltung der ersteren in je 1 Mol Acetaldehyd, Kohlensäure und Glycerin

$$C_6H_{12}O_6 = CH_3 \cdot CO \cdot COH + C_3H_8O_3, \text{ bzw.}$$
$$= CH_3 \cdot COH + CO_2 + C_3H_8O_3$$

formulierungsgemäß möglich erscheint. Zusammenhänge zwischen Brenztraubensäure und Glycerin offenbaren sich sodann in dem Umstande, daß ein äquimolekulares Gemisch von Brenztraubensäure und Glycerin bei der Einwirkung von Hefe auffallende Besonderheiten zeigt [Neuberg und Kerb[2])].

Während die mit dem Zerfall der Brenztraubensäurestufe einsetzenden Gärungsprozesse als geklärt gelten können, sind die Teilvorgänge unbekannt, die von der C_6-Reihe in die C_3-Reihe führen. Die einzige verwertbare chemische Analogie für einen solchen Reaktionsverlauf besteht in der Einwirkung alkalisch reagierender Stoffe auf Zucker. Schon früher war aus einer Untersuchung von G. Pinkus[3]) bekannt, daß starke Laugen unter Umständen eine Umwandlung des Zuckers in das Methylglyoxal bewirken. Diese Substanz ist nicht nur besonders reaktionsfähig und für den Zerfall nach verschiedenen Richtungen hin geeignet, sondern sie kann auch allein in etwa 22 monomolekularen Formen[4]) auftreten. Die einzige bisher

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. **58**, 158, 1913; C. Neuberg, Monographie. Jena **1913**.

[2]) C. Neuberg und Joh. Kerb, Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **1**, 114, 1912; Ber. **46**, 2225, 1913.

[3]) G. Pinkus, Ber. **31**, 31, 1898.

[4]) Außer den 8 in der Monographie 1913 und den 2 weiteren (diese Zeitschr. **55**, 503, 1913) angeführten Formen können noch folgende 12 nebst verschiedenen Anhydriden in Betracht gezogen werden:

in Substanz dargestellte Modifikation des Methylglyoxals, aller Wahrscheinlichkeit nach die beständigste, bringt nur eine jener zahlreichen Möglichkeiten zum Ausdruck, und erscheint eben wegen ihrer vermutlich stabilen Natur als die ungeeignetste für die experimentelle Prüfung des Verhaltens zu den Gärungsenzymen. Da sie aber trotzdem durch Fermente nach den Feststellungen von C. Neuberg[1]) sowie Dakin und Dudley[2]) angegriffen wird, so ist keinesfalls das letzte Wort über die Rolle eines der Methylglyoxale als Zwischenstufe beim Zuckerzerfall (A. Wohl) gesprochen.

Bestärkt wird man in einer solchen Vermutung durch die Befunde von C. Neuberg und W. Oertel[3]) sowie von C. Neuberg und B. Rewald[4]), gemäß denen nicht nur die von Pinkus benutzte starke Natronlauge, sondern bemerkenswerterweise auch schwach alkalisch reagierende Substanzen, wie Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Dinatriumphosphat, Ammoniak, Sulfite, Borate und Phosphate, den gleichen Übergang der Zuckerarten in Methylglyoxal zuwege bringen. Auf Grund dieser Vorstudien ist dann, wie Neuberg und Färber schon 1916 ausführlicher dargelegt haben, die Untersuchung der Hefengärung bei alkalischer Reaktion aufgenommen als ein neuer Weg zur Erforschung der Gärungsvorgänge. Dieser konnte — entgegen den vorliegenden älteren Erfahrungen — mit Vertrauen beschritten werden nach unserer Feststellung[5]), daß selbst von leben-

---

11) $CH_3 \cdot C(OH):CO$, 12) $CH_3 \cdot C(OH):C(OH)_2$, 13) $CH(OH):CH \cdot CHO$, 14) $CH(OH):CH \cdot CH(OH)_2$, 15) $CH_2OH \cdot CH:CO$, 16) $CH_2:C:C(OH)_2$ und die zyklischen Gebilde (vgl. C. Bülow und R. Engler, Ber. 51, 1248, 1918):

17) $CH_2\left\langle\begin{array}{l}COH\\ \|\\ COH\end{array}\right.$, 18) $CH_2\left\langle\begin{array}{l}{}^*C(OH)\\ \;|>O\\ {}^*CH\end{array}\right.$, 19) $CH_2\left\langle\begin{array}{l}CO\\ |\\ {}^*CHOH\end{array}\right.$,

20) $CH_2\left\langle\begin{array}{l}C(OH)_2\\ |\\ {}^*CHOH\end{array}\right.$, 21) $CH\left\langle\!\!\!\begin{array}{l}/\!\!/ C(OH)\\ |\\ {}^*CHOH\end{array}\right.$, 22) $CH\left\langle\begin{array}{l}C(OH)_2\\ |\\ \backslash\!\!\backslash CH\end{array}\right.$.

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **49**, 502; **51**, 484; **55**, 501, 1913.

[2]) H. D. Dakin und H. W. Dudley, Journ. of Biolog. Chem. **14**, 157, 1913.

[3]) C. Neuberg und W. Oertel, diese Zeitschr. **55**, 495, 1913.

[4]) C. Neuberg und B. Rewald, diese Zeitschr. **71**, 144, 1915.

[5]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **71**, 51 und 57, 1915.

der Hefe getrennte Zymase die Berührung mit Ätzalkalien und anderen basischen Stoffen verträgt. Um aber zunächst Einflüsse der lebenden Substanz auszuschließen, wurden jene unter dem Namen „Alkalisatoren" von Neuberg und Färber zusammengefaßten alkalisch reagierenden Salze erstmalig auf rein enzymatische Göransätze zur Anwendung gebracht, d. h. auf zellenfreie Hefenmacerationssäfte. Dabei wurde bewiesen, daß die alkalische Vergärung sowohl der Monosaccharide Traubenzucker und Fruchtzucker als des Disaccharides Rohrzucker in gleicher Weise möglich ist. Als besonders bemerkenswert konnte damals auch der Umstand hervorgehoben werden, daß der Rohrzucker in den alkalischen Lösungen glatt vergoren wird, daß also die Hefeninvertase trotz der herrschenden hohen Konzentration an Hydroxylionen entgegen früheren Vorstellungen wirksam ist.

Abgesehen von verschiedenen Einzelheiten, die für das Problem der Vergärung in alkalischer Lösung von Wichtigkeit sind, haben Neuberg und Färber folgende gemeinsame Eigenschaft der Alkalisatoren in ihrer Anwendung auf die zellfreie Gärung beschrieben: Die Alkalisatoren beeinflussen den Gärungsvorgang in doppelter Weise. Einmal liegt eine allgemeine, von der OH-Ionenkonzentration abhängige Gärungshemmung vor; sodann wirken die Alkalisatoren auf die Teilvorgänge der enzymatischen Zuckerspaltung, die sich vor dem Eintritt der Kohlensäureentwicklung abspielen. Leitet man dagegen diese vorbereitenden Stufen des Zuckerzerfalls bei der normalen natürlichen Acidität ein, so wird nach erfolgter Angärung das System gegen alkalische Zusätze verhältnismäßig unempfindlich und verträgt nunmehr erhöhte Alkalisatorkonzentrationen, die ohne voraufgegangene Angärung die Zuckerspaltung hemmen.

Neuberg und Färber haben nicht nur die zellfreie alkoholische Gärung in recht stark alkalischen Lösungen durchführen können, sondern sie haben bereits 1916 darauf hingewiesen, daß auch für die alkalische Vergärung mittels lebender Hefen die Verhältnisse prinzipiell ebenso liegen. Der nachstehende Teil dieser in das Jahr 1913 zurückgehenden Untersuchungen kann wegen des Krieges erst jetzt mitgeteilt werden.

Außer den früher gemachten Angaben über die gelegentliche Wahl eines alkalischen Gärgutes sind noch folgende zu erwähnen, welche die Anwendung von Hefe in alkalischem Milieu betreffen. Die Zuckervergärung ist, wie C. Neuberg und Mitarbeiter[1]) zeigten, auch unter Zusatz nicht unbeträchtlicher Mengen Ammoniak möglich. Ammoniumcarbonat hat F. Ehrlich[2]) benutzt, um den Eiweißstoffwechsel der Hefe zu beeinflussen, teilweise zum Zwecke des Ersatzes organischer Stickstoffnahrung durch mineralische. Zu ähnlichen Versuchen diente O. Neubauer und K. Fromherz[3]) ein Gemisch von Chlorammonium und Natriumbicarbonat, also ebenfalls kohlensaures Ammoniak. In beiden Fällen war die OH-Ionenkonzentration verhältnismäßig gering.

Von wirklicher Bedeutung für die Frage ist eine eingehende Studie über die Beeinflussung von Zellvorgängen durch Salze in ihrer Abhängigkeit von der Stellung der betreffenden Elemente im periodischen System, die vor 10 Jahren von Julius Kiß[4]) veröffentlicht ist. Der Autor hat u. a. die Einwirkung von Laugen und alkalisch reagierenden Salzen wie Natriumacetat, Dinatriumphosphat, Dinatriumarsenit, Borax, Natriumhydrocarbonat, Natriumsilicat usw. auf lebende Hefen und auf die Gärungskurven untersucht und je nach den Konzentrationsverhältnissen Beschleunigung oder Hemmung des Gärverlaufs nachgewiesen. Auch den Einfluß der Temperatur auf die Wirkung seiner alkalischen Salze hat Kiß verfolgt. Er bringt die Effekte der anorganischen Zusätze ganz allgemein mit den osmotischen Vorgängen in Zusammenhang und betrachtet die Einflüsse auf die Lebensfunktionen der Hefe als Äußerungen der Plasmolyse oder richtiger Cytolyse. Seine wichtigsten Befunde kommen in folgenden Angaben zum Ausdruck:

„Die Gärung tritt in der Zuckerlösung, der 0,05 g-Äquivalent Kali- oder Natronlauge zugesetzt wird, etwas verspätet auf. Dieselbe wird aber doch in geringem Grade beschleunigt. Man kann den Mischungen

---

[1]) C. Neuberg und H. Steenbock, diese Zeitschr. 52, 501, 1913; C. Neuberg und E. Welde, diese Zeitschr. 62, 480, 1914; C. Neuberg, diese Zeitschr. 71, 57, 1915.

[2]) F. Ehrlich, Ber. 40, 1041 und 1043, 1907.

[3]) O. Neubauer und K. Fromherz, H. 70, 342, 1911.

[4]) Julius Kiß, Das periodische System der Elemente und ihre Giftwirkung. Von der kgl. Gesellsch. d. Ärzte in Budapest gekrönte Preisschrift. 1909.

succesive in fraktionierten kleinen Dosen bedeutende Mengen Lauge zusetzen, und die Kohlensäureentwicklung tritt nach kleinen Pausen immer wieder ein. . . . . Die Ursache der Anfangsretardierung der Gärung liegt nicht darin, daß die Kohlensäure gebunden wird, sondern die Anfangsretardierung ist für die Wirkung der Lauge selbst charakteristisch. Dies wird durch die Beobachtung der Wirkung eines alkalischen Salzes ebenfalls bestätigt. Diese Salze beschleunigen nämlich die Gärung; dieselbe entwickelt sich aber immer bloß nach einer längeren Anfangsretardation."

„Dem entspricht die an der Hefe gemachte Beobachtung, daß die Gärung durch Laugen anfangs gehemmt wird, die Lebensfunktion der Hefe wird also anfangs scheinbar herabgesetzt. Nach der Anfangsretardation entfaltet aber die Hefe eine gesteigerte Tätigkeit, die Hefe ist also tatsächlich doch nicht geschädigt, sondern in einen Zustand versetzt, der für die spätere Entfaltung ihrer Tätigkeit günstiger ist."

„Als letzte Konsequenzen ergeben sich folgende Sätze: Die Verhältnisse, die für die Tätigkeit der Hefenzellen am günstigsten sind, sind jenen analog, unter denen sich die Zellen der entwickeltesten tierischen Organismen, so u. a. auch die Blutzellen, tatsächlich befinden."

„Merkwürdigerweise sind aber für das Wachstum der Hefe die günstigsten Verhältnisse nicht dieselben, die die Gärungsgeschwindigkeit am günstigsten beeinflussen. . . . . Im allgemeinen werden aber (für die Entwicklung) säurehaltige Nährböden bevorzugt."

Aber auch diese beachtenswerte Abhandlung von Kiß befaßt sich lediglich mit der Kinetik der Hefenwirkung sowie mit der Morphologie der Erreger. Sie hat so wenig wie irgendeine andere Arbeit einen Beitrag zur Frage eines veränderten Gärungs-Chemismus erbracht. Der von Neuberg und Färber bereits früher zitierten Zusammenfassung von E. Hägglund ist vielmehr zu entnehmen, daß bei den ehemals im Höchstfall benutzten Alkalikonzentrationen von 0,048 n-NaOH oder K_2CO_3 praktisch keine Unterschiede von der Norm in der nach 5 Tagen erhaltenen Gesamt-Alkoholausbeute festzustellen waren.

Demgegenüber hatten die von Neuberg und Färber anwendbar befundenen höheren Alkalisatorkonzentrationen den erwarteten Erfolg gehabt und die oben erwähnten experimentellen Änderungen im chemischen Verlaufe der alkoholischen Gärung zuwege gebracht.

Eine weitgehende Klärung der Verhältnisse ist inzwischen für die Wirkungsweise der sekundären schwefligsauren Salze als

Alkalisatoren von Neuberg und Reinfurth[1]) erbracht. Diese Salze führen eine Wandlung des Gärungs-Chemismus herbei, indem sie sich substanziell mit einem Produkt der Zuckerspaltung vereinigen. Neuberg und Reinfurth haben dargetan, daß der als Zwischenstufe auftretende Acetaldehyd mit den schwefligsauren Salzen reagiert und in Form des Acetaldehyd-bisulfitkomplexes sich in der Gärlösung anreichert. Auch bei sehr erheblichem Gehalt an Alkalisulfiten, z. B. bei einer Anwendung von etwa 150°/₀ Natriumsulfit vom Gewichte des benutzten Zuckers, geht die Gärung zu Ende. Dabei entstehen nahezu 75°/₀ der theoretisch möglichen Menge an Acetaldehyd. Es konnte nicht nur die Acetaldehyd-bisulfit-Doppelverbindung aus dem Gärgut dargestellt, sondern auch die Abhängigkeit der Aldehydausbeute von der Sulfitkonzentration eindeutig bewiesen werden: Die Aldehydmenge wächst mit dem Gehalt an schwefligsaurem Salz. Es handelt sich, wie Neuberg und Reinfurth eingehend dargelegt haben, hierbei in letzter Linie um eine Abfangung des Acetaldehyds. Derselbe wird eben durch die Bindung an das Sulfit, die so fest ist, daß sie von den biologischen Agenzien nicht gelöst wird, der in der letzten Phase des Gärungsvorganges sich abspielenden Reduktion zum Äthylalkohol entzogen. Da aber unter den Gärungsgasen kein Wasserstoff auftritt (und auch nicht etwa eine Reduktion des angewendeten schwefligsauren Salzes statthat), so muß ein dem Oxydationsprodukt Acetaldehyd entsprechendes Reduktionsprodukt auftreten. Diese Folgerung der Theorie war voll bewiesen worden durch die Auffindung einer der Aldehydausbeute jeweils korrelativen Menge Glycerin[1]). Hinsichtlich der Gewinnung von Glycerin tritt übrigens mit diesen Untersuchungen das jüngst bekannt gewordene technische Ergebnis von W. Connstein und K. Lüdecke[2]) in Beziehung, die auf dem selben Wege, wie ihn in den vorerwähnten Arbeiten Neuberg und seine Mitarbeiter beschritten haben zu einer wichtigen industriellen Darstellung von Glycerin aus Zucker gelangt sind. Die Ursachen der korrelativen Bildung von

---

[1]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 365 u. 92, 234, 1918.

[2]) W. Connstein und K. Lüdecke, Vortrag in der Sitzung der Deutsch. chem. Ges. vom 14. IV. 1919.

Glycerin und Acetaldehyd sind von Neuberg und Reinfurth (l. c.) weitgehend geklärt. Den wesentlichen Anstoß zur Änderung des Gärverlaufes gibt die Fesselung der Aldehydstufe. Der Acetaldehyd verbindet sich in stöchiometrischem Verhältnis mit dem schwefligsauren Natrium zum Acetaldehydsulfitkomplex. Wegen der Dissoziation dieser Verbindung ist ein Überschuß an schwefligsaurem Salz erforderlich. Je größer aber die Sulfitkonzentration ist, je mehr also die Dissoziation zurückgedrängt werden kann, um so höher steigt die Aldehydausbeute. Ihr folgt in vollkommener Parallele die Kurve des Glycerins. Da Aldehyd das Molekulargewicht 44, Glycerin das von 92 hat, so entsteht rund doppelt so viel Glycerin wie Acetaldehyd. Die veränderte Gärungsgleichung nimmt also die Form an:

$$C_6H_{12}O_6 = CH_3 \cdot CHO + CO_2 + C_3H_8O_3.$$

Daß die Acetaldehydbildung die Glycerinproduktion bedingt und nicht etwa umgekehrt, ergibt sich daraus, daß auch bei Bakteriengärungen[1]), wo von Glycerinerzeugung keine Rede ist, Sulfite den Aldehyd hervorlocken und daß dabei wie im Falle der Hefengärung der ganze Vorgang proportional ist der Menge des Aldehydabfangmittels (Sulfit). Die Festlegung des Acetaldehyds hat die Verwendung des sonst — gemäß der Formulierung

$$\begin{aligned} {}^1/_2\, C_6H_{12}O_6 &= CH_3 \cdot CO \cdot CO_2H + 2\,H, \\ CH_3 \cdot CO \cdot COOH &= CO_2 + CH_3 \cdot CHO, \\ CH_3 \cdot COH + 2\,H &= CH_3 \cdot CH_2OH \end{aligned}$$

— zu seiner Hydrierung dienenden Wasserstoffs durch ein anderes Zuckerhalbmolekül zur Folge. Die Annahme einer etwaigen primären Entstehung des Glycerins scheitert auch an der durch keine chemische Erfahrung zu stützenden unmittelbaren Herleitung des Glycerinmoleküls aus einer Hexose, während die Bildung der Brenztraubensäure, die ja die direkte Vorstufe des Acetaldehyds darstellt, durchaus verständlich und vielfach erläutert ist.

Bei jener Wirkung der Sulfite ist das alkalische Medium nicht die ausschlaggebende Bedingung, weil nämlich der gleiche

[1]) C. Neuberg u. F. F. Nord, diese Zeitschr. 96, 133 u. 158, 1919.

Erfolg auch mit neutral reagierenden Sulfiten[1]) zu erreichen ist, sondern die Affinität der schwefligsauren Salze zum Acetaldehyd. Der gleichsinnige Effekt des in Wasser praktisch unlöslichen $CaSO_3$ einerseits, derselbe Erfolg der Zusätze auch bei zellfreien Gärungen andererseits zeigt, daß osmotische Erscheinungen, also Einflüsse der Salze auf die Hefenzellen, nur eine untergeordnete Rolle spielen dürften. Mit anderen Worten: Der an der Aldehydphase bewirkte Eingriff in die Reaktionsfolge muß als der wesentliche Faktor gelten. Neuberg und Färber hatten auch bereits bei der Anwendung der Alkalisatoren auf die zellfreie alkoholische Gärung einen Unterschied im Verhalten der Alkalisulfite und der übrigen alkalischen Salze bemerkt und hervorgehoben. Während nämlich die 0,1 bis 0,2 molare Konzentration der Alkalisatoren im Gärgut in allen sonstigen Fällen die dosis tolerata darstellte, lag die Grenze der vollkommenen Vergärbarkeit in Anwesenheit sekundärer schwefligsaurer Alkalien bei einem 10mal geringeren Gehalt, nämlich bei 0,02 molekular. Dieses Verhalten findet wohl seine Erklärung eben in der spezifischen Anteilnahme des Sulfits an dem Reaktionsmechanismus.

Und trotzdem wirken die Sulfite und die übrigen alkalisch reagierenden Salze wesensgleich. Den Beweis dafür und zugleich die Aufklärung der hier zugrunde liegenden Vorgänge erbringen die nachstehenden Ausführungen.

Vergärt man Zucker in Gegenwart eines alkalisch reagierenden Salzes, z. B. Natriumcarbonat, so tritt nach kurzer Zeit, wie schon Neuberg und Färber angegeben hatten, Acetaldehyd auf. Aber im Gegensatz zur Sulfitgärung, in deren Verlauf die Aldehydmenge ansteigt, bedingt die Zugabe von doppeltkohlensaurem Natrium keine solche Anreicherung. Auffallenderweise verschwindet vielmehr der zunächst entstandene Acetaldehyd wieder ziemlich rasch. Dieses Verhalten erläutert folgende Übersicht:

Bei der Vergärung einer 8,55%igen Lösung von Rohrzucker mit einer dem Zuckergewicht gleichen Menge Preßhefe und unter Zugabe von nahezu der halben Menge Natriumhydro-

---

[1]) C. Neuberg, Zeitschr. f. Botanik **11**, 1918.

carbonat (genau entsprach sie einer 0,5 molekularen Lösung) wurden erhalten:

nach $1^1/_2$ Std. $0{,}44\,^0/_0$ Acetaldehyd vom Gewichte des Zuckers;
„ $2^1/_2$ „ $0{,}58\,^0/_0$ „ „ „ „ „ ;
„ $3^1/_2$ „ $0{,}42\,^0/_0$ „ „ „ „ „ ;
„ $4^1/_2$ „ $0{,}33\,^0/_0$ „ „ „ „ „ ;
„ $5^1/_2$ „ $0{,}18\,^0/_0$ „ „ „ „ „ ;
„ 24 „ $0{,}07\,^0/_0$ „ „ „ „ „ .

Wie man sieht, erreicht die Aldehydbildung ihr Maximum nach $2^1/_2$ Stunden, wo die größte Menge des Zuckers noch ungespalten zugegen ist, während am Schluß der Vergärung, der unter diesen Bedingungen nach 24 Stunden erreicht war, nur noch Spuren Acetaldehyd vorhanden sind. Auf der Höhe des Versuches traten also $0{,}6\,^0/_0$ Aldehyd auf. Bei anderen ähnlichen Ansätzen sind wir bis zu $0{,}7\,^0/_0$ gelangt. Diese Mengen sind klein im Vergleich mit dem erzielbaren Aldehydertrage bei der Sulfitgärung. Sie sind aber ganz gewaltig, wenn man die normale Vergärung in Parallele zieht, bei der zumeist nur eine qualitativ erkennbare Spur, selten mehr als $0{,}01\,^0/_0$, also eine 70fach geringere Menge, auftritt. Diese Verhältnisse lassen sich, wie im experimentellen Teil beschrieben wird, auch in qualitativen Versuchen auf das deutlichste an Hand der so charakteristischen Nitroprussidnatriumreaktion vorführen.

Die Aufarbeitung des oben erwähnten Versuches ergab nun für 1000 ccm Gärgut, ursprünglich 85,5 g Rohrzucker (= 90 g Sechskohlenstoffzucker) enthaltend, nur 37,8 g Spiritus statt der im Falle einer normalen alkoholischen Zuckerspaltung erhältlichen 46,0 g. Dafür aber war die beträchtliche Glycerinmenge von 8,6 g = $9{,}6\,^0/_0$, also mehr als das 3fache der Norm, gebildet. Das noch bestehende Defizit an nicht gasförmiger kohlenstoffhaltiger Substanz war nur zum allerkleinsten Teile durch Acetaldehyd gedeckt, dessen Menge sich bloß auf 0,064 g belief. Es war also zunächst ein ungeklärtes Manko an einer Substanz vorhanden, die ein Oxydationsäquivalent für das Reduktionsprodukt Glycerin darstellt.

In ihren Betrachtungen über die Verhältnisse der natürlichen Glycerinbildung bei der alkoholischen Gärung haben Neuberg und Reinfurth (l. c. S. 381 u. 246) bereits auf die große Bedeutung hingewiesen, die einigen im Gärgut vorhandenen Säuren

in diesem Zusammenhange zukommt, nämlich auf die in freier wie in gebundener Form auftretende Essigsäure und die Bernsteinsäure. Für eine vermehrte Bildung der letzteren haben wir keine Anhaltspunkte gefunden, wohl aber stellte sich bald heraus, daß Essigsäure, auf die schon Neuberg und Reinfurth gefahndet hatten, in bedeutender Menge zugegen ist. Die eingehende Prüfung dieses Punktes hat nun gezeigt, daß in dem Falle der Vergärung in bicarbonatalkalischer Lösung Essigsäure das volle Äquivalent für die auftretende Glycerinmenge abgibt.

Woraus geht nun diese damit zu einer besonderen Bedeutung gelangende Essigsäure hervor? Oxydative Bildungen etwa aus gleichzeitig entstandenem Weingeist oder auch aus dem intermediär erzeugten Acetaldehyd (s. vorher und im folgenden) sind auszuschließen, da der ganze Vorgang anaerob in einer Kohlensäureatmosphäre sich abspielt. Es muß also ein anderer Entstehungsmechanismus vorliegen. Auf den richtigen Weg weist die zuvor mitgeteilte Beobachtung, daß der anfangs reichlich und konstant auftretende Acetaldehyd wieder verschwindet und zum Schlusse nur noch in Spuren vorhanden ist. Der Acetaldehyd kann nun noch auf einem anderen Wege als durch Oxydation in Essigsäure übergehen, nämlich durch gleichzeitige Disproportionierung zweier Moleküle in je 1 Mol Äthylalkohol und Essigsäure, d. h. durch den Eintritt der Cannizzaroschen Reaktion. Daß ausschließlich diese Aldehydumwandlung statthat, geht auf das deutlichste aus zwei Umständen hervor, und zwar aus folgenden: Einmal findet die jeweils erzeugte, mit der Konzentration des Alkalibicarbonats zunehmende Glycerinmenge ihr volles Gegenstück in dem Essigsäurequantum, das der Hälfte der dem Glycerin äquivalenten (im Verhältnis 1 Mol: 1 Mol stehenden) Menge Acetaldehyd entspricht. Andererseits ist die Alkoholausbeute größer, als die vorhandene Glycerinmenge zulassen würde. Dieser Alkoholzuwachs wird jedoch wiederum angenähert gedeckt durch ein Spritquantum, wie es gemäß der Kohlenstoffmenge aus der anderen Hälfte der dislozierten Acetaldehydmoleküle hervorgeht[1]).

Diese Verhältnisse kommen, soweit sie die Essigsäure be-

[1]) Wir haben keinen Anhaltspunkt bisher für die Möglichkeit gefunden, daß Acetaldehyd durch Übergang in Acetal oder in Essigsäureäthylester verschwindet.

treffen, zum klaren Ausdruck bei allen von uns gewählten wechselnden Konzentrationen an Natriumbicarbonat, die von 0,5 molekular über die maximale Löslichkeit hinaus bis zu einem der 3fach molekularen Menge entsprechenden Gehalte stiegen. Die erwähnte Alkoholzunahme, die auf eine Cannizzarosche Umlagerung von Acetaldehyd zu beziehen ist, tritt jedoch deutlich nur in den Ansätzen zutage, die Natriumbicarbonat bis zu einem Gehalt von 0,75 molekular enthielten und tatsächlich vollständig ausgegoren waren. Daß sich bei den höheren Konzentrationen diese Relation nicht scharf zu erkennen gab, liegt daran, daß gemäß dem Ausfall der Probe mit Fehlingscher oder Ostscher Lösung noch ein Rest reduzierenden Zuckers übrig blieb und allem Anscheine nach mehr Kohlenhydrat für den Erhaltungsumsatz der Hefe verwendet wird, als bei der normalen alkoholischen Zuckerspaltung.

Damit nimmt die Gärungsgleichung für diese Form der Zuckerspaltung in alkalischer Lösung folgende Endformulierung an:

α) $C_6H_{12}O_6 = C_3H_8O_3 + CO_2 + CH_3 \cdot CHO$;

β) $CH_3 \cdot CHO + {}^1/_2 H_2O = {}^1/_2 C_2H_5 \cdot OH + {}^1/_2 CH_3 \cdot COOH$.

Jedes Molekül Essigsäure ist aus 2 Molekülen Aldehyd hervorgegangen. 1 Molekül Essigsäure (60 g) entspricht also 2 Molekülen Glycerin (184 g). Die Daten des nachfolgenden experimentellen Teiles zeigen, daß in der Tat die gefundenen Essigsäuremengen mindestens $^1/_3$ der jeweils vorhandenen Gewichtsmenge Glycerin ausmachen.

Bei der alkalischen Gärung ist somit das Novum vorhanden, daß ein Teil des gebildeten Äthylalkohols nicht der durch die klassische Gärungsgleichung zum Ausdruck gebrachten Zerfallweise des Zuckermoleküls seine Entstehung verdankt, sondern der Disproportionierung intermediär gebildeten Acetaldehyds.

Übrigens liegen auch bereits andere Erfahrungen vor, die den Eintritt der Cannizzaroschen Reaktion des Acetaldehyds bei den Gärungsvorgängen dartun. A. Trillat und B. Sauton[1]) scheinen die ersten gewesen zu sein, die diese Art von Veränderung am Aldehyd beobachtet haben. Freilich ist ihre Deutung eine andere gewesen und kann auch nicht allgemein zutreffen, indem sie die Umwandlung wie auch die Bildung des Acetaldehyds als eine Wirkung des Luftsauerstoffs ansprachen. Die Umlagerung des Acetaldehyds nach Cannizzaro ist erst von

---

[1]) A. Trillat und B. Sauton, Compt. rend. **146**, 645 u. **147**, 77, 1908.

C. Neuberg und Joh. Kerb[1]) bei Betrachtungen über die sekundäre Umwandlung des bei der Brenztraubensäuregärung entstandenen Acetaldehyds beschrieben und erörtert sowie schließlich auch von S. Kostytschew[2]) untersucht worden.

Im besten Einklange mit den Ergebnissen der alkalischen Gärung und ihrem Resultat, daß die Essigbildung auf der Disproportionierung des primär hervorgebrachten Acetaldehyds beruht, befindet sich nun auch unsere Feststellung, daß die Hefe fertig zugesetzten Acetaldehyd weit vollkommener und schneller in bicarbonatalkalischer Lösung umzuwandeln vermag als in dem gewöhnlich herrschenden sauren Medium. Dabei handelt es sich nicht etwa um eine rein chemische Beeinflussung des Acetaldehyds, sondern um eine biologische, da unter den gegebenen Bedingungen Acetaldehyd durch doppeltkohlensaures Natrium allein keinerlei Veränderung erfährt.

Die Entstehungsweise des Glycerins und der Essigsäure ist damit vollständig geklärt, und so gewinnt die früher von Neuberg und Reinfurth (l. c.) ausgesprochene Vermutung, daß auch diese bei der normalen Gärung auftretenden Produkte ursächlich zusammenhängen, neue Stützen.

Für die Richtigkeit einer solchen Auffassung läßt sich noch anführen, daß nach den Untersuchungen von Kayser die in so wechselnder Menge vorhandene flüchtige Säure der Gärungserzeugnisse stets fast ausschließlich Essigsäure ist, und die Feststellung von A. Fernbach[3]), nach der jede Verminderung der natürlichen Acidität des Mediums von der Hefe mit einer gesteigerten Bereitung von Essigsäure beantwortet wird. Die Säureproduktion darf vielleicht bis zu einem gewissen Grade als ein Ausdruck für das Bestreben der Hefe gelten, die durch die OH-Ionen veranlaßte Umstimmung des Stoffwechsels möglichst rückgängig zu machen. Der Umstand (s. S. 186 u. 195), daß die Säureentwicklung über das Äquivalentverhältnis für das entstehende Glycerin sogar herausgeht, erinnert geradezu an das oft zu beobachtende biologische Bestreben der Überkompensation. Die Untersuchungen von Fr. Boas und H. Leberle[4]) haben zu der wichtigen Feststellung geführt, daß die Säurebildung bei Hefen und Pilzen mit dem Stickstoffumsatz zusammenhängt. Daher erscheint es durchaus möglich, daß ein

---

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. 58, 168, 1913.

[2]) S. Kostytschew H. 89, 367, 1914.

[3]) A. Fernbach, Compt. rend. 156, 77, 1913.

[4]) Fr. Boas und H. Leberle, diese Zeitschr. 90, 78 und 92, 170, 1918.

Teil des Säureüberschusses dem N-Stoffwechsel entstammt, der wohl ziemlich sicher durch das alkalische Milieu beeinflußt wird. Nach einer interessanten Hypothese von F. Knoop und E. Kerteß[1]) dient die Brenztraubensäure zu den oft beobachteten physiologischen Acetylierungen. Der Weg, auf dem die Brenztraubensäure diese Aufgabe verfolgt, wird wohl auch über den Acetaldehyd führen und zum mindesten bei den anaeroben Verwendungen in dessen Disproportionierung bestehen. Die Knoopsche Theorie verknüpft diese Vorgänge sehr glücklich mit den Eiweiß- und Kohlenhydratumsetzungen. Auf alle diese Zusammenhänge wirft die „korrelative Essigsäureentstehung" ein neues Licht.

Die flüssigen Produkte, die bei der alkalischen Gärung auftreten, sind also im Falle der Verwendung von Natriumbicarbonat Alkohol, Glycerin, Essigsäure sowie Acetaldehyd. Von einer genauen Bestimmung der Kohlensäure haben wir abgesehen, da dieselbe wenigstens aus 5 verschiedenen Quellen herrühren dürfte. Kohlendioxyd wird gebildet außer durch die gleichzeitig ablaufende normale Zuckerspaltung:

$$C_6H_{12}O_6 = 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2$$

auch durch den Zerfall gemäß der abgeänderten Gärungsgleichung:

$$C_6H_{12}O_6 = C_3H_8O_3 + CH_3 \cdot CHO + CO_2$$

und durch eine Einwirkung der dann entwickelten Säure (Essigsäure) auf das zugesetzte Natrium bicarbonicum. Unter den Bedingungen des Versuches ist die Dissoziation des Natriumhydrocarbonats ebenfalls in Betracht zu ziehen sowie eine in ihrem Umfange schwer zu beurteilende Entstehung von Kohlendioxyd durch Stoffwechselvorgänge, welche die Gärung begleiten, aber für das alkalische Milieu ganz unerforscht sind. Wir haben daher die exakte Ermittelung der Kohlensäure zurückgestellt, bis insbesondere calorimetrische Messungen vorliegen, die einen Einblick in den veränderten Stoffumsatz der Hefe gestatten.

Sucht man sich ein Bild vom Wesen der Gärung bei alkalischer Reaktion zu machen, so kann man wohl folgende Auffassung als die wahrscheinlichste bezeichnen: Den Anstoß zu allen Veränderungen gibt der Eingriff in die Aldehydphase. Bei der Gärung in Gegenwart von Sulfiten wird durch dieses Abfangmittel der Acetaldehyd festgehalten, sozusagen aus der

---

[1]) F. Knoop und E. Kerteß, H. 71, 252, 1911.

Kette der Reaktionen beseitigt. Diese Ausschaltung hat zur Folge, daß die normalerweise als Schlußakt des Gärungsvorganges sich abspielende Hydrierung des Acetaldehyds unmöglich wird. Infolgedessen sucht sich der „Gärungswasserstoff", der seiner normalen Bestimmung entzogen ist, ein anderes Angriffsobjekt; er bewirkt an einem Zuckerhalbmolekül die Reduktion zu Glycerin. Somit entstehen Glycerin und Acetaldehyd stets genau in korrelativem Verhältnis.

Im Falle der Vergärung in Gegenwart von Natriumbicarbonat ist gleichfalls die an der Aldehydphase einsetzende Veränderung das bestimmende Moment. Nicht durch Fixation, sondern durch Disproportionierung scheidet hier der Acetaldehyd aus der normalen Reaktionsfolge aus. Wieder sind zunächst Glycerin und Acetaldehyd in genau äquimolekularem Verhältnis entstanden. Aber infolge Eintritts der Cannizzaroschen Umlagerung geben 2 Mol Acetaldehyd in je 1 Mol Essigsäure und Alkohol über. Zu Beginn der alkalischen Gärung ist der Acetaldehyd in erheblicher Menge wirklich nachzuweisen, zum Schlusse finden sich hauptsächlich seine erwähnten Umwandlungsprodukte vor. Glycerin und Essigsäure sind in diesem Falle einander entsprechende Gärprodukte, und zwar besteht, da 1 Mol Essigsäure aus 2 Mol Acetaldehyd hervorgegangen ist, die Beziehung von 2 Mol Glycerin : 1 Mol Essigsäure.

Auch bei den phytochemischen Reduktionen findet die Hydrierung in der ursprünglichen Produktion von Acetaldehyd ihr Gegenstück. Das ist nachzuweisen für die Bildung von primären und sekundären Alkoholen aus Aldehyden und Ketonen, die einer gärenden Zuckerlösung zugesetzt wurden[1]). Derselbe Zusammenhang besteht zwischen Aldehyd und Mercaptan bei der Reduktion von Thioaldehyden[2]) durch arbeitende Hefe.

---

[1]) C. Neuberg und A. Lewite, diese Zeitschr. 91, 257, 1918.

[2]) C. Neuberg und F. F. Nord, diese Zeitschr. 67, 46, 1914 und F. F. Nord, Ber. 52, 1207, 1919.

Alle diese Prozesse sind nach einer Richtung hin wesensgleich. Sie lassen sich nämlich betrachten auch unter dem Gesichtspunkte, daß hier eine von außen kommende, zugefügte Verbindung den Acetaldehyd aus der normalen Reaktionsfolge verdrängt, den „Gärungswasserstoff" auf sich ablenkt, also zu einer Hydrierung verwendet, und als ein entsprechendes Oxydationsäquivalent so Acetaldehyd übrig läßt. Bei der Glycerinbildung handelt es sich um die ähnliche Verwendung des „Gärungswasserstoffs" durch einen internen Acceptor.

In großartiger Weise enthüllt sich so die zentrale Stellung des Acetaldehyds.

Experimenteller Teil.

I. Über die Aldehydbildung bei Zusatz von Natriumbicarbonat zu gärenden Zuckerlösungen.

a) 8,55 g Rohrzucker (= 9,0 g Hexosen) wurden mit 2,1 g Natriumbicarbonat in 80 ccm Wasser gelöst[1]); nach Zusatz von 9 g obergäriger Hefe (Rasse M) sowie der Nährsalze wurde das Volumen auf 100 ccm gebracht. Das Gemisch wurde gut durchgeschüttelt und die Hefe gleichmäßig verteilt. Das Gärgut reagierte kräftig alkalisch auf Lackmus; der Gehalt an $NaHCO_3$ entsprach dem einer 0,25 molekularen Lösung. Nach kurzem Verweilen im Brutschrank bei 35° trat unter Kohlensäureentwicklung Gärung ein. Schon nach 50 Minuten, deutlicher jedoch nach 2 bis 3 Stunden, konnte mit Hilfe der Riminischen Reaktion unmittelbar im Gärgut oder in den ersten Tropfen seines Destillates das Auftreten von Acetaldehyd nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden war die Gärung beendet und die Ostsche Probe zeigte keine reduzierende Substanz mehr an; gleichzeitig aber fiel jetzt auch die Aldehydreaktion negativ aus.

---

[1]) In einigen Fällen wurde der Rohrzucker zunächst mit heißer verd. HCl hydrolysiert. Da jedoch die Hefeninvertase gemäß der früheren Befunde von Neuberg und Färber auch in bicarbonatalkalischer Lösung wirkt, kann die Saccharose unmittelbar verwendet werden.

b) ein zweiter Gäransatz, der $NaHCO_3$ in einer Menge von 0,5 molekular enthielt, verlief in gleicher Weise.

c) Um das Quantum des bei der Gärung in $NaHCO_3$-alkalischem Medium entstandenen Acetaldehyds zu ermitteln und um zugleich einen Einblick in den Vorgang seines Verschwindens zu gewinnen, wurde folgender Versuch angestellt:

171 g Rohrzucker (180 g Hexosen entsprechend) wurden in 1000 ccm Wasser gelöst, dazu 180 g obergärige Hefe M sowie an Nährsalzen 2 g Ammoniumsulfat, 1 g Dinatriumphosphat, 2 Tropfen Magnesiumsulfatlösung und 1 Kryställchen Kaliumchlorid gegeben. Nach Hinzufügung von 84 g Natriumbicarbonat wurde das Volumen auf 2000 ccm aufgefüllt. (Konzentration an $NaHCO_3 = 0{,}5$ m.) Die stark alkalische Mischung wurde bei 35° der Gärung überlassen. Nach $1^1/_2$ Stunden wurden zur quantitativen Aldehydbestimmung 100 ccm Gärgut abpipettiert. Um eine Zerstörung von Acetaldehyd durch Alkali auszuschließen, geschah die nachfolgende Destillation unter Zugabe von Chlorbarium, das aus dem Natriumhydrocarbonat kohlensauren Baryt erzeugt ($2\,NaHCO_3 + BaCl_2 = 2\,NaCl + H_2O + CO_2 + BaCO_3$), also abstumpfend wirkt. Zu diesem Zwecke wurden die 100 ccm Gärgut zusammen mit 50 ccm einer 25%igen Chlorbariumlösung in dem von Neuberg und Reinfurth (l. c.) beschriebenen Apparate der Destillation im Dampfstrom unterworfen. Im Übergegangenen wurde nach dem Ripperschen Verfahren der Aldehydgehalt ermittelt. Weitere Aldehydbestimmungen wurden dann in stündlicher Folge mit je 100 ccm Gärgut vorgenommen; die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt:

100 ccm Gärgut enthielten: nach	mg Acetaldehyd
$1^1/_2$ Stunden	40
$2^1/_2$ „	52
$3^1/_2$ „	38
$4^1/_2$ „	30
$5^1/_2$ „	16
24 „	6.

Ein anschauliches Bild von dem Erscheinen des Acetaldehyds zu Anfang sowie von seinem Verbrauch mit fortschreitender

Gärung gibt die graphische Darstellung der gewonnenen Resultate in Fig. 1.

Der Acetaldehyd war nach $2^1/_2$ Stunden in größter Menge gebildet, nach 24 Stunden aber nur noch in Spuren nachweisbar.

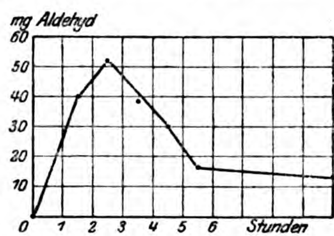


Fig. 1. Bildung und Verbrauch von Acetaldehyd bei der Vergärung in Anwesenheit von Natriumbicarbonat.

Durch die nebenstehende Kurve wird der Verlauf des Prozesses, der den intermediär gebildeten Aldehyd zum Verschwinden bringt, d. i. der von der Hefe katalysierten Cannizzaroschen Reaktion, folgendermaßen charakterisiert: Der Vorgang setzt nicht gleich mit dem Beginn der Gärung, sondern mit einer deutlichen Verzögerung ein; dann erreicht er nach wenigen Stunden eine solche Intensität, daß, obwohl noch erhebliche Mengen Zucker verarbeitet werden, nur noch Spuren von unverändertem Acetaldehyd in Erscheinung treten.

d) In einem Gäransatz von gleicher Zusammensetzung wie dem eben beschriebenen konnte nach 3 Stunden ein Aldehydgehalt von 594 mg im Liter festgestellt werden, während nach 24 Stunden die Nitroprussidreaktion nur noch geringe Spuren von Aldehyd anzeigte.

Dieses Verhalten — Auftreten von Acetaldehyd im Anfange des Gärungsvorganges und sein Verschwinden im weiteren Verlaufe — wurde bei den später zu beschreibenden Versuchen, die sich mit der Ermittelung der Gärungsendprodukte befassen, durch qualitative Prüfung durchgehends festgestellt. Acetaldehyd ist also ein charakteristisches Produkt der alkalischen Gärung.

II. Versuche über das Verschwinden des wäßrigen Hefesuspensionen zugesetzten Acetaldehyds bei natriumbicarbonatalkalischer Reaktion.

Daß zugesetzter Aldehyd von der lebenden Hefe in alkalischem Medium verarbeitet wird und daß Bicarbonat die Disproportionierung des Acetaldehyds durch die Hefe be-

schleunigt, gibt sich deutlich in nachstehenden Ansätzen zu erkennen.

a) Zu 150 ccm einer 0,746 $^0/_0$igen wäßrigen Acetaldehydlösung wurden 27 g obergärige Hefe M und 12,6 g Natriumhydrocarbonat gegeben[1]; das Volumen wurde auf 300 ccm aufgefüllt. Das alkalisch reagierende Gemisch hatte somit einen Gehalt an Acetaldehyd von 0,373 $^0/_0$ und an $NaHCO_3$ entsprechend dem einer 0,5-m Lösung. Nach 24 stündigem Stehen im Brutschrank wurde in 100 ccm Flüssigkeit eine Acetaldehydmenge von 0,013 g festgestellt. Es waren somit 96,5 $^0/_0$ des zugesetzten Aldehyds umgewandelt.

b) Gleichzeitig waren zu 150 ccm einer 0,746 $^0/_0$igen Aldehydlösung 27 g obergärige Hefe M gegeben, war ein Volumen von 300 ccm hergestellt und das Gemisch, das die natürliche saure Reaktion der Hefensuspensionen aufwies, 24 Stunden im Brutschrank belassen. Es wurden sodann in 100 ccm Flüssigkeit 0,183 g Acetaldehyd gefunden. Der Verlust an Acetaldehyd betrug also nur 50,9 $^0/_0$ der zugesetzten Menge.

c) 75 ccm einer 0,746 $^0/_0$igen Acetaldehydlösung wurden allein mit 6,3 g $NaHCO_3$ versetzt; das Volumen der Flüssigkeit wurde auf 150 ccm aufgefüllt. Der Gehalt an $NaHCO_3$ entsprach wieder dem einer 0,5-m Lösung. Das Gemisch wurde 24 Stunden bei 35° aufbewahrt; in 100 ccm wurden nunmehr von den zugesetzten 0,373 g Acetaldehyd 0,370 g, also praktisch 100 $^0/_0$, wiedergefunden.

Das Ergebnis des letztbeschriebenen Versuches ist, daß Acetaldehyd durch ein $NaHCO_3$-alkalisches Milieu allein während der Versuchszeit nicht verändert wird. Für das Verschwinden des Acetaldehyds in den beiden vorangehenden Ansätzen ist somit die zugefügte Hefe verantwortlich. Es ist in diesem Zusammenhange als bemerkenswert die Tatsache hervorzuheben, daß unter den gegebenen Verhältnissen der Acetaldehyd durch Hefe in alkalischem Medium fast quantitativ zum Verschwinden gebracht wurde, während bei der natürlichen sauren Reaktion der Hefensuspension etwa die Hälfte des zugesetzten Acetaldehyds unangegriffen blieb.

---

[1]) d. h. wie stets 9 $^0/_0$ Hefe.

III. Feststellung der Endprodukte der Gärung in Gegenwart von Natriumbicarbonat.

Von einem Ansatz gemäß Versuch Ic (S. 191), der 8,55 % Rohrzucker (entsprechend 9 % Hexosen) enthielt und dessen Gehalt an $NaHCO_3$ dem einer 0,5-m Lösung entsprach, wurde nach beendeter Gärung, als die Ostsche Probe keine reduzierende Substanz mehr anzeigte, die Hefe abfiltriert und das Filtrat zur Ermittelung der Gärungsendprodukte verarbeitet.

a) Von 250 ccm Filtrat wurden 150 ccm abdestilliert und das Übergegangene durch anreichernde Rektifikation konzentriert. Die quantitative Bestimmung des Alkohols erfolgte pyknometrisch und ergab 9,46 g Alkohol. Für 100 ccm Gärgut betrug die Alkoholmenge 3,78 g = 42 Gewichtsprozente des angewendeten Zuckers.

b) 250 ccm Filtrat wurden mit 125 ccm einer 25 %igen Bariumchloridlösung im Dampfstrom destilliert. Im Destillate wurden nach der Ripperschen Methode 0,016 g Acetaldehyd festgestellt. In 100 ccm Gärgut waren also 0,0064 g Acetaldehyd enthalten, die den verschwindend kleinen Prozentsatz von 0,07 % des angewendeten Zuckers darstellten.

c) 250 ccm Filtrat wurden im Faust-Heimschen Apparat bei 25 bis 30° bis zur Trockenheit eingeengt und sodann in der von Neuberg und Reinfurth beschriebenen Weise von den alkoholätherunlöslichen Substanzen befreit. Nach dem Wiederaufnehmen des Extraktes mit Wasser wurde die Lösung auf ein Volumen von 50,0 ccm gebracht und die Glycerinbestimmung nach Zeisel und Fanto im Stritarschen Apparate ausgeführt. Es wurde für 100 ccm Gärgut eine Menge von 0,86 g Glycerin = 9,7 % des angewendeten Zuckers gefunden.

Dieser Wert stellt mehr als das Dreifache des bei der normalen Gärung auftretenden Glycerins dar, und es war zu erwarten, daß korrelativ zur Vermehrung dieses Reduktionsproduktes die erhöhte Bildung eines Oxydationsproduktes stattgefunden hatte. Die als Gärungsenderzeugnis ermittelte Menge von Acetaldehyd war viel zu gering, um ein ausreichendes Äquivalent für die gesteigerte Glycerinerzeugung darzustellen. Das beschriebene Auftreten und Wiederverschwinden des Acet-

aldehyds gab den Hinweis, in einem Umwandlungsprodukte des Acetaldehyds den Ausgleich zu suchen.

d) 250 ccm Filtrat wurden mit verdünnter Schwefelsäure[1]) kongosauer gemacht und der Destillation im Wasserdampfstrom unterworfen. Flüchtige Säure ging über, und es wurde die Behandlung so lange fortgesetzt, als eine saure Reaktion des Destillates gegen Lackmus nachweisbar war. Im ganzen wurden 11 Liter Destillat gewonnen, dessen Säurewert durch Titration ermittelt wurde. Auf diese Weise wurde die in 250 ccm Gärgut enthaltene Menge flüchtiger Säure gleich 13,3 ccm n-NaOH gefunden. Nach der unten beschriebenen Untersuchung erwies sich die zugrunde liegende Substanz als Essigsäure. Die Umrechnung hierauf ergab für 100 ccm Gärgut 0,32 g Essigsäure Damit ist das dem Gärungsglycerin entsprechende Oxydationsprodukt in ausreichender Menge vorhanden. Für 0,86 g Glycerin waren 0,28 g nach der Cannizzaroschen Reaktion entstandener Essigsäure zu erwarten; die erzielte Ausbeute übertraf diesen Wert noch ein wenig. Hierfür können drei Umstände verantwortlich gemacht werden:

1. geht die Hefe in Gegenwart stärkerer Alkalikonzentrationen, bei denen die höchsten Werte erhalten wurden, offenbar in erhöhtem Maße und vielleicht unter Bildung saurer Produkte zugrunde, oder es könnten auch im eigentlichen Eiweißstoffwechsel der lebenden Hefezellen Säuren gebildet werden.

2. Der Titrationswert schließt auch die stets entstehende Menge „unspezifischer“ flüchtiger Säuren ein und

3. kommt ein methodischer Fehler in Betracht, der darin besteht, daß bei der großen Verdünnung die alkalimetrische Bestimmung zu hohe Essigsäurezahlen gibt.

Die Identifizierung der Essigsäure geschah in folgender Weise: Der gesamte Rest des Destillats wurde mit NaOH gerade alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade zum geringen Volumen eingedampft. Der Rückstand wurde sodann mit Salpetersäure neutralisiert und mit konzentrierter Silbernitratlösung versetzt. Hierbei schied sich ein dickflockiger

---

[1]) Später wendeten wir gemäß dem alten Vorschlage Liebigs (Annal d. Chem. 57, 128, 1846; vergl. E. Salkowski, Arch. f. d. ges. Physiol. 2, 351, 1869) Weinsäure an.

weißer Niederschlag ab; er wurde abgesaugt, ausgewaschen und im evakuierten Dunkel-Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet. 0,1251 g Substanz ergaben 0,0807 g Ag.

$CH_3.COO$ Ag. Ber. Ag = 64,66 %; gef. Ag = 64,51 %.

Demnach liegt Essigsäure vor. Übrigens zeigten auch die bei der Verbrennung oder Erwärmen mit Mineralsäuren entwickelten Dämpfe den für Essigsäure charakteristischen stechenden Geruch.

e) Zur vergleichsweisen Bestimmung der flüchtigen Säuren, die bei der normalen, in saurem Medium stattfindenden Gärung auftreten, wurden 43 g Rohrzucker, entsprechend 45 g Hexosen, in 250 ccm Wasser gelöst; dazu wurden 45 g derselben Hefe sowie die üblichen Mengen Nährsalze gefügt und das Volumen auf 500 ccm aufgefüllt. Nach Beendigung der Gärung wurden 150 ccm Gärgut mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und im Wasserdampfstrom destilliert. Es wurden 6200 ccm Destillat übergetrieben, zu deren Neutralisierung 3,8 ccm n-NaOH nötig waren. Auf Essigsäure bezogen, würde diese Zahl 0,15 g in 100 ccm Gärgut bedeuten. Tatsächlich jedoch erwiesen Darstellung und Untersuchung des Silbersalzes, daß eine so große Menge Essigsäure gar nicht entstanden sein konnte. Gab man zu dem bei der alkalischen Reaktion eingeengten und sodann mit Salpetersäure neutralisierten Destillate konzentrierte Silbernitratlösung, so entstand schnell ein schwarzer Niederschlag. Nach Beseitigung der Ameisensäure und der ihr etwa sonst noch beigemengten reduzierenden Substanz wurde nur eine Spur Silberacetat gewonnen. Der bei diesem Ansatz gefundene Glyceringehalt von 0,26 g in 100 ccm Gärgut entsprach der bei normaler Gärung auftretenden Glycerinmenge von rund 3 % des umgesetzten Zuckers.

IV. Abhängigkeit der Ausbeute an Endprodukten der Gärung von den verschiedenen Konzentrationen an $NaHCO_3$.

Die Wechselbeziehung zwischen den bei der Hefeeinwirkung in alkalischem Medium auftretenden Gärungsprodukten Glycerin und Essigsäure muß, wenn die Gärungstheorie richtig ist, unter allen Bedingungen obwalten, d. h. jede experimentell hervorgerufene Veränderung der produzierten Glycerinmenge muß von einer gleichsinnigen quantitativen Verschiebung der Essigsäurebildung begleitet sein.

Zur Prüfung dieser Frage wurden 8 Gärversuche (a bis h) mit gleichem Zucker- und Hefengehalt, jedoch mit zunehmender Konzentration an Natriumbicarbonat in folgender Weise angesetzt:

43 g Rohrzucker, in denen 45 g Hexosen enthalten sind, wurden in 250 ccm Wasser gelöst; dazu wurden 45 g Hefe M

sowie die üblichen Mengen Nährsalze gegeben. Alsdann wurden folgende Mengen an Natriumbicarbonat zugefügt:

	$NaHCO_3$ g	Molekularer Gehalt an $NaHCO_3$
bei a)	0,0	0,0,
„ b)	21,0	0,5,
„ c)	31,5	0,75,
„ d)	42,0	1,0,
„ e)	63,0	1,5,
„ f)	84,0	2,0,
„ g)	105,0	2,5,
„ h)	126,0	3,0.

Nachdem die Volumina in allen Fällen auf 500 ccm gebracht worden waren, bestand in den verschiedenen Gäransätzen der im 2. Stabe der vorstehenden Tabelle bezeichnete molekulare Gehalt an Natriumbicarbonat. Es muß jedoch bemerkt werden, daß die Löslichkeit des zugesetzten Natriumbicarbonats bei einer m-Lösung ihre Grenze erreichte, so daß bei den höheren Konzentrationen das nicht gelöste $NaHCO_3$ als Bodenkörper vorlag. Alle 8 Gäransätze wurden gleichzeitig bei einer Temperatur von 35° angesetzt und belassen. Der Eintritt der Kohlensäureentwickelung erlitt eine mit ansteigender $NaHCO_3$-Konzentration fortschreitende Verzögerung; in gleicher Weise wurde der Abschluß der Gärung hinausgeschoben. Die höheren Konzentrationen hatten zur Folge, daß nach Beendigung des Gäraktes geringe Mengen nicht vergorenen Zuckers vorhanden waren.

Die für die Gärungsendprodukte gefundenen Werte, die nach den in Versuch S. 194 und 195 beschriebenen Methoden ermittelt wurden, sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt.

Für 100 ccm Gärgut (= 9,0 g Sechskohlenstoffzucker) wurden gefunden:

	Mit einem molekularen Gehalt $NaHCO_3$ von	Alkohol g	Glycerin g	Durch Titration ermittelte Essigsäure g
in a)	0,0	4,16	0,22	–
„ b)	0,5	3,27	0,89	0,26,
„ c)	0,75	3,10	1,00	—
„ d)	1,00	3,00	1,07	0,40,
„ e)	1,5	2,77	1,23	0,50,
„ f)	2,0	—	1,30	—
„ g)	2,5	2,78	1,30	0,50,
„ h)	3,0	2,77	1,30	0,50.

Die mit der Erhöhung der $NaHCO_3$-Konzentration des Gärgutes wachsende Zunahme an Glycerin und die in korrelativem Verhältnis gleichermaßen gesteigerte Produktion von Essigsäure sowie die durch eine vermehrte Bildung beider bedingte Abnahme des Äthylalkohols treten deutlich zutage und kommen sinnfällig durch die graphische Darstellung in Figur 2 zum Ausdruck.

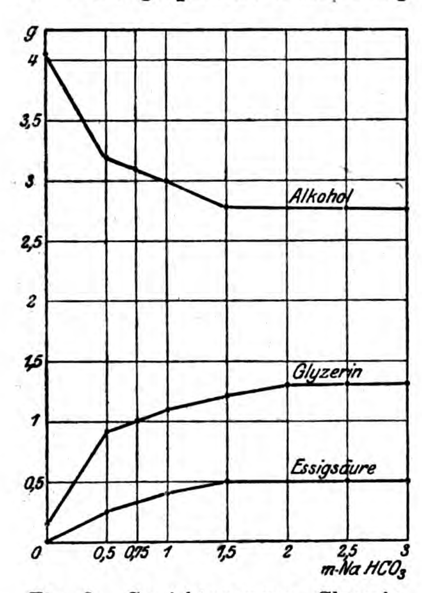


Fig. 2. Gewichtsmengen Glycerin, Essigsäure und Alkohol, die aus 8,55 g Rohrzucker (= 9,0 g Hexosen) bei der Vergärung in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Natriumbicarbonat entstehen.

Die Theorie der Gärung findet in allen 8 Versuchen ihre volle Bestätigung.

Aus den zuvor S. 187 und 195 dargelegten Gründen ist die Essigsäure sogar im Überschuß über die zur Deckung des Glycerinäquivalentes erforderliche Menge vorhanden. Überschritt die Konzentration an Natriumhydrocarbonat das Löslichkeitsmaximum dieses Salzes, so blieb übrigens die Menge aller drei Gärungsendprodukte trotz vermehrter Massen von $NaHCO_3$-Bodenkörper konstant. Es ist bemerkenswert, welche gewaltigen Mengen Natriumhydrocarbonat von der Hefe ertragen werden.

Das gleiche Ergebnis hatten auch zwei kleinere Versuchsreihen mit Trauben- sowie Rohrzucker. Die Ansätze i bis o enthielten wieder steigende $NaHCO_3$-Mengen. Die Resultate seien in tabellarischer Zusammenstellung (S. 199) kurz mitgeteilt.

Wie gewaltig die durch das Bicarbonat verursachte Verschiebung unter den Produkten der alkoholischen Gärung ist, geht am klarsten daraus hervor, daß die erzielte Glycerinmenge[1]) bis zur Hälfte der Alkoholausbeute steigt, während in der Norm das

[1]) 1,3 bis 1,37 g Glycerin aus 9 g Hexose sind rund 15 % vom Gewicht des angewendeten Zuckers und 28,3 bis 29,8 % der theoretisch möglichen Menge.

Verhältnis Glycerin : Alkohol wie 2,5 bis 3 : 50, d. h. $= {}^1/_{20}$ bis ${}^1/_{17}$ obwaltet. Gleichzeitig schnellt auch die Essigsäureausbeute bis auf den 17fachen Betrag von dem im Höchstfalle bei normaler Gärung beobachteten[1]) Wert, von 0,33 % auf 5,7 % des angewendeten Zuckers, empor.

In 100 ccm Gärgut (entsprechend 9 g angewendeter Glucose und 9 g Hefe) wurden gefunden:

	mit einem molekularen Gehalt an $NaHCO_3$ von	Alkohol g	Glycerin g	Durch Titration bestimmte Essigsäure g
in i)	0,0	3,90	0,24	—
„ k)	0,5	2,78	1,04	0,45,
„ l)	1,5	2,34	1,37	0,51.

In 100 ccm Gärgut (entsprechend 8,55 g Rohrzucker und 9 g Hefe) wurden gefunden:

	mit einem molekularen Gehalt an $NaHCO_3$ g	Alkohol g	Glycerin g	Durch Titration bestimmte Essigsäure g
in m)	0	3,75	0,26	0,09,
„ n)	0,5	3,15	1,10	0,31,
„ o)	1,5	2,72	1,27	0,50.

Es sei noch erwähnt, daß in einigen Fällen die Silberbestimmung des aus dem Destillate dargestellten Acetates etwas zu niedrig ausfiel, was auf die Beimischung einer höher molekularen flüchtigen Säure hinwies. Nach dem bei der Verbrennung der Silbersalze entwickelten Geruch schien es sich dabei um kleine Mengen Buttersäure[2]) gehandelt zu haben.

Die Vergrößerung der $NaHCO_3$-Konzentration hat eine gleichzeitige Vermehrung von Glycerin und Essigsäure zur Folge, gemäß ihrer Abhängigkeit voneinander, die das Verhältnis von 1 Mol Glycerin zu ${}^1/_2$ Mol Essigsäure herstellt. Die Essigsäure entsteht durch Disproportionierung primär gebildeten Acetaldehyds. Als zweites Produkt der Umwandlung geht hierbei Äthylalkohol aus Aldehyd hervor. Diese Spritmenge muß mit wachsender Bicarbonat-Alkalescenz — im Gegensatz zu dem sinkenden Quantum des eigentlichen Gärungsalkohols — infolge

[1]) E. Buchner u. J. Meisenheimer, Ber. **38**, 622, 1905.

[2]) Diese Buttersäure dürfte auch aus Acetaldehyd über das Aldol herzuleiten sein.

des gesteigerten Eintritts der Aldehydzwischenstufe in die einfache Cannizzarosche Reaktion zunehmen.

Die nachfolgende Versuchsreihe, deren $NaHCO_3$-Konzentration nur bis 0,75-molekular reicht und bei der die Vergärung des angewandten Zuckers zu Ende geführt werden konnte, bringt die Beziehung des „Cannizzaro-Alkohols“ zur Glycerinbildung deutlich zum Ausdruck, und zwar durch die nachstehend beschriebene virtuelle Steigerung des Gesamt-Zuckerumsatzes. Es wurden 4 Gärversuche (Nr. p bis s) mit gleichem Zucker- und Hefengehalt, jedoch mit zunehmender $NaHCO_3$-Konzentration in folgender Weise angestellt:

43 g Rohrzucker (45 g Sechskohlenstoffzucker äquivalent) wurden in 250 ccm Wasser gelöst. Hierzu wurden 45 g obergärige Hefe sowie die notwendigen Nährsalze gegeben; nunmehr wurden ansteigende Mengen an Natriumbicarbonat zu den einzelnen Göransätzen gefügt, und zwar

	$NaHCO_3$ g	Molekularer Gehalt der Lösung an $NaHCO_3$ g
zu p)	0,0	0,0 ,
„ q)	10,5	0,25,
„ r)	21,0	0,5 ,
„ s)	31,5	0,75.

Stets wurde ein Gesamtvolumen von 500 ccm hergestellt.

Nach 48stündigem Verweilen im Brutschrank war die Gärung beendet und keine reduzierende Substanz im Gärgut praktisch mehr nachweisbar. Die Bestimmung der als Gärungsendprodukte auftretenden Mengen von Alkohol und Glycerin ergab die in nachfolgender Tabelle zusammengestellten Werte.

In 100 ccm Gärgut, 9,0 g Hexosen entsprechend, waren vorhanden:

bei Versuch	mit einem molekularen Gehalt an $NaHCO_3$ von	Glycerin g	Zur Glycerinbildung verbrauchter Zucker in g	Alkohol g	Zur Alkoholbildung verbrauchter Zucker in g	Summe des verbrauchten Zuckers g
p)	0,0	0,26	0,51	3,97	7,77	8,28,
q)	0,25	0,67	1,31	3,58	7,04	8,35,
r)	0,5	0,95	1,86	3,35	6,55	8,41,
s)	0,75	1,23	2,41	3,17	6,20	8,61.

Wenn man die zur Bildung des Glycerins und des Alkohols verbrauchten Zuckermengen, die ihrerseits aus der abgeänderten und aus der normalen Gärungsgleichung zu berechnen sind, addiert, wie es in der letzten Spalte der vorstehenden Tabelle geschehen ist, so ergibt sich ein gesteigerter Zuckerumsatz mit zunehmender Konzentration an $NaHCO_3$. Ein Grund für einen stärkeren Zuckerzerfall bei vermehrter Bicarbonat-Konzentration ist nicht einzusehen, zumal der nicht ganz restlose Zuckerverbrauch bei größeren Alkalinitäten eher das Gegenteil anzeigt. Die Erhöhung des Gesamtzuckerverbrauchs ist auch nur eine scheinbare und erklärt sich aus der Tatsache, daß die durch Analyse bestimmte Alkoholmenge neben dem „Gärungsalkohol" auch den „Cannizzaro-Alkohol" einschließt. Das Zuckeräquivalent des letzteren ist jedoch bereits durch dasjenige des Glycerins ausgedrückt, da beide Substanzen ja gemäß der für die alkalische Gärung abgeleiteten Gleichung

$$\alpha)\quad C_6H_{12}O_6 = C_3H_8O_3 + CO_2 + CH_3\cdot CHO \quad \big\downarrow {}^1/_2\, H_2O$$

$$\beta)\quad \overbrace{{}^1/_2\, CH_3\cdot COOH + {}^1/_2\, C_2H_5\cdot OH}$$

aus ein und derselben Zuckermenge hervorgehen. Der nach dieser Formulierung gespaltene Zuckeranteil wächst mit der Alkalinität. Auf der doppelten Einbeziehung dieses durch Disproportionierung entstandenen Alkohols in die Bilanz beruht jene virtuelle Steigerung des Zuckerumsatzes. Sie bringt ebenfalls die korrelative Bildung von Glycerin und Acetaldehyd — letztere ausgedrückt im Spritäquivalent — für den Fall der alkalischen Gärung zur Anschauung.

Die Endgleichung für die Entstehung des Glycerins findet in allen Fällen ihren Ausdruck in vorstehender Formulierung α. Der hervorgebrachte Acetaldehyd bleibt, wenn die Gärung in Gegenwart schwefligsaurer Salze erfolgt, unverändert (durch Bindung als Sulfit-Komplex). Bei Anwendung von Salzen ohne spezifische Affinität zum Aldehyd erleidet dieser Disproportionierung zu Äthylalkohol und Essigsäure (gemäß obiger Formulierung β). Hier entstammt also ein Teil des Weingeistes nicht einem Zuckerzerfall nach der klassischen Gärungsgleichung, sondern einer richtigen Cannizzaroschen Reaktion zweier Moleküle Acetaldehyd.

Die Veränderung, die mit den Gärprodukten unter dem Einfluß von Natriumhydrocarbonat erfolgt, ist sehr bedeutend (s. S. 197 und 199) und kommt zur Geltung in einem Sinken des Alkoholertrages und einer Erhöhung der Mengen an Essigsäure, Glycerin sowie an Acetaldehyd, welch letzterer besonders zu Beginn des Gäraktes in vermehrtem Umfange auftritt. Trotz der erheblichen Toleranz der Hefe gegen Natriumbicarbonat erreicht die dadurch bewirkte Verschiebung verhältnismäßig

schnell einen Grenzwert, der durch einen gesteigerten Zusatz des alkalischen Salzes sich nicht weiter ändert. Dieser Zustand tritt schon ein, lange bevor die Gärung unterbunden oder auch nur wesentlich gehemmt wird. Darin liegt ein Unterschied gegenüber dem von schwefligsauren Alkalien ausgeübten Einfluß. Ihre Leistungsfähigkeit hinsichtlich der Fixation der Aldehydstufe und der korrelativen Glycerinbildung wird durch die Toleranzgrenze der Hefe bestimmt. Die maximale Auswirkung des Natriumbicarbonats erfolgt dagegen schon bei einer noch ungiftigen schwächeren Konzentration; trotzdem geht ein geringerer Teil des Zuckers in die in diesem Falle einander entsprechenden Gärprodukte Glycerin und Essigsäure über. So erreicht die Ausbeute an Glycerin bei der Sulfitgärung[1]) 70°/₀ der theoretisch möglichen, während sie unter dem Einflusse des doppeltkohlensauren Natriums bei 28,3°/₀ stehen bleibt. Ein Grund für dieses Verhalten ist nicht ohne weiteres ersichtlich; vielleicht ist er in dem Umstande zu suchen, daß unter der Wirkung des Natriumbicarbonats eine der Hefe wenig adäquate Leistung gefordert wird, nämlich die Disproportionierung von Acetaldehyd[2]). Möglicherweise steht für diesen Vorgang nur eine beschränkte Menge Ferment zur Verfügung, oder erleidet dieses unter den Versuchsbedingungen eine Beeinträchtigung.

---

[1]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. **92**, 250, 1918.

[2]) Anmerkung bei der Korrektur: Alle die experimentell erreichbaren Abänderungen des Gärungsvorganges knüpfen sich an das Auftreten von Acetaldehyd. Dasselbe ist schon in der mehrfach zitierten Mitteilung hierüber von Neuberg und Färber im Jahre 1916 beschrieben. Im letzten Heft der Zeitschr. f. physiol. Chem. (**105**, 189, 1919) bemerken nun Euler und Svanberg in einer Veröffentlichung „Enzymatische Studien über Zuckerspaltung", daß Neuberg und Färber auf die Mitteilung von Euler mit Tholin und Hammarsten ebenfalls aus dem Jahre 1916 keinen Bezug genommen hätten und offenbar andere Ziele verfolgten. Diese Vermutung der Autoren trifft in der Tat zu. Denn die Untersuchungen von Neuberg und Färber eröffneten einen neuen Weg zu einem Einblick in die Gärungsvorgänge. Er bestand darin, experimentelle Abänderungen im Chemismus der Gärungsendprodukte hervorzurufen. Davon ist in den Untersuchungen Eulers und seiner Mitarbeiter aus dem Jahre 1916 mit keinem Worte die Rede, so wenig wie in irgendeiner anderen früheren Mitteilung, sie befassen sich vielmehr mit der Kinetik des Gärungsvorganges; in ihrer neuen Publikation aus dem Jahre 1919 bestätigen die Autoren die gesteigerte Glycerinbildung bei der Vergärung in Gegenwart von alkalischem Phosphat sowie die Wirksamkeit der Invertase bei alkischer Reaktion gemäß den Ergebnissen von Neuberg, Färber und Reinfurth.

Die Wirkungsweise der Verbandstoffe in physiologisch-chemischer Hinsicht.

Von

Alexander Belák.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 4. März 1919.)

Die Verbandstoffe werden im allgemeinen als Mittel ohne jede Wirkung betrachtet, die nur dazu dienen, die betreffenden Oberflächen mechanisch zu schützen und die Wundsekrete aufzusaugen. Die in der neueren Zeit immer eindringlicher studierten Adsorptionserscheinungen legen nun nahe, an diese Prozesse auch bei den Verbandstoffen zu denken. Ein genaueres Studium dieser Verhältnisse scheint um so mehr gerechtfertigt, als wir gewisse Anhaltspunkte zu suchen gezwungen sind, nach denen die Brauchbarkeit der Verbandstoffersätze zu beurteilen wäre. Es war uns nicht möglich, unsere Untersuchungen etwa durch Tierversuche auch nach der praktischen Seite hin auszudehnen, deshalb beschränkten wir uns auf die Untersuchung gewisser physikalischen Eigenschaften der Verbandstoffe, die unseres Wissens bis jetzt ausständig sind. Es hat sich vor allem darum gehandelt, festzustellen, ob Adsorptionserscheinungen bei den Verbandstoffen eine Rolle spielen könnten und ob diesbezüglich ein Unterschied zwischen Friedens- und Kriegsmaterial bzw. Ersätzen aufzufinden wäre. Neben der Farbstoffadsorption wurden näher untersucht die Adsorption von Säure und Lauge, die Fermentadsorption, sodann die Eiweiß- und Bakterienadsorption. Die Toxinadsorption, auf die wir ein gewisses Gewicht zu legen geneigt wären, konnte zufolge den jetzigen Umständen nur am toxinähnlichen Ricin geprüft werden.

Bevor wir zur Beschreibung unserer Versuche übergehen, muß einiges über das angewandte Material vorausgeschickt werden. Die Friedensbaumwolle bestand nur aus Baumwollfäden, während der Kriegsware Leinenfäden zugemischt waren. In Wasser aufgeschwemmt, haben beide Sorten wenig Säure abgegeben, indem sich das Wasser mit Kongo violett färbte; diese Eigenschaft konnte auch an mehreren Friedenssorten nachgewiesen werden. Zu einigen Versuchsreihen, namentlich bei denen uns diese Säureabgabe besonders wichtig erschien, haben wir gewaschene Baumwolle verwendet. Das Waschen bestand in mehrmaligem Ausschwemmen mit dest. Wasser und Trocknen im Luftstrom. Da die Baumwolle selbst nach dieser Vorbehandlung eine schwache, mit Phenolphthalein versetzte Lösung von Lauge oder alkalische Caseinlösung entfärbte, so haben wir in einigen Versuchen eine mit einer schwachen Natronlauge gewaschene Baumwolle verwendet; die Lauge wurde so lange zugesetzt, bis sie mit Phenolphthalein ihre schwach rötliche Farbe beibehielt. — Die Papierwatte (Zellstoff) enthielt keine Baumwolle. — An Gazen wurden, außer den imprägnierten, ebenfalls eine Friedenssorte und eine Kriegssorte verwendet. Die imprägnierten Gazen stammten alle noch vom Frieden her.

Die Adsorption.

Die Farbstoffadsorption. Von Farbstoffen wurden ein basischer (Methylenblau) und ein saurer (Indigocarmin) verwendet.

Eine abgewogene Menge des Verbandstoffes (0,10 g) wurde mit 20 ccm einer 0,15 %igen Farbstofflösung zusammengebracht, gut zusammengeschüttelt, 8 Stunden stehen gelassen, die Farbstofflösung abgegossen und colorimetrisch untersucht. Zur Feststellung des Farbstoffverlustes wurde das Authenrieth-Königsbergersche Colorimeter[1]) angewandt. Die Skala des Colorimeters wurde mit verschiedenen Verdünnungen der ursprünglichen Lösung geeicht und somit konnte der bei der Adsorption verschwundene Farbstoff in Prozenten der Ausgangskonzentration ermittelt werden. Dieses Colorimeter, das zu derartigen Untersuchungen meines Wissens noch keine Verwendung fand, erwies sich als ein sehr brauchbares und bequemes Instrument zu verschiedenen Adsorptionsstudien.

Die Ergebnisse sind aus Tabelle I ersichtlich. Von den beiden Farbstoffen wird durchwegs nur das basische Methylenblau adsorbiert; vom sauren Indigocarmin findet durch die untersuchten Sorten keine Adsorption statt; eine Adsorption von 2 bis 3 %, wie bei der Kriegswatte und Dermatolgaze angegeben, ist als Versuchsfehler zu betrachten. Was

---

[1]) Hellige, Freiburg i. Br.

Tabelle I.

Adsorbens	Es wurden adsorbiert %	
	Methylenblau	Indigocarmin
Baumwollwatte (Friedensware)	27	0
„ (verunreinigte Kriegsware)	31	2
Papierwatte (Zellstoff)	41	0
Gaze (Friedensware)	10	0
„ (verunreinigte Kriegsware)	26	0
Jodoformgaze	11	0
Dermatolgaze	8	3
Xeroformgaze	9	0

die Methylenblauadsorption anbelangt, so sieht man vor allem, daß ein erheblicher Unterschied zwischen Watten und Gazen besteht; letztere adsorbieren zufolge ihrer geringeren Oberflächenentwicklung schwächer. Es besteht weiter ein Unterschied zwischen den verschiedenen Sorten derselben Gattung. Friedenswatte adsorbiert schwächer (27%) als Kriegswatte (31%), und diese wieder schwächer als Papierwatte (41%). Baumwollwatte steht also, was die Adsorptionsfähigkeit anbelangt, der Papierwatte nach. Die Verunreinigung der Baumwollwatte mit Leinenfasern in der Kriegswatte ist durch die Adsorbierbarkeit von Methylenblau deutlich nachzuweisen. Zwischen den Gazesorten besteht ein ähnlicher Unterschied zwischen Friedens- und Kriegsware; derselbe ist ebenfalls auf eine Verunreinigung des Friedensstoffes zurückzuführen. Die imprägnierten Gazesorten weisen ein ähnliches Adsorptionsvermögen wie die Friedensgaze auf. Durch das Imprägnieren wird also die Adsorptionsfähigkeit, wie man es vielleicht im vorhinein vermuten könnte, nicht gesteigert, eher herabgesetzt.

Säure- und Laugenadsorption. Sie wurde auf folgende Weise untersucht: je 2 g Verbandstoff wurden mit je 20 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsäure bzw. Natronlauge zusammengebracht, mit einem Glasstab tüchtig durchgeknetet, sodann ausgepreßt und je 5 ccm dieses Preßsaftes mit $^{n}/_{10}$-Lauge bzw. -Säure zurücktitriert. Die Adsorption dauerte nicht länger als etwa 10 Minuten. — Aus 20 ccm Lösung adsorbierten je 2 g

Friedensbaumwollwatte	0 ccm Säure,	3,6 ccm Lauge
Papierwatte	1,6 „ „	7,6 „ „
Gaze (Friedensware) .	0,4 „ „	1,8 „ „

Die Säureadsorption ist somit nur bei der Papierwatte nennenswert; Gaze adsorbierte weniger Säure und Baumwollwatte überhaupt keine. Dieser letztere Umstand könnte darauf zurückgeführt werden, daß, wie oben erwähnt, die Baumwollwatte bereits mit Säure gesättigt ist und sogar dem dest. Wasser wenig Säure abgibt. Viel deutlicher ist die Adsorption von Lauge, und zwar bei allen untersuchten Sorten. Am stärksten adsorbiert die Papierwatte, am geringsten Gaze. Man könnte daran denken, daß es sich speziell bei der Baumwolle um eine einfache chemische Neutralisierung handle, jedoch reicht die Säureabgabe durch Watte keineswegs zur Neutralisierung von 1,6 ccm $^{n}/_{10}$-Lauge aus; wir haben unter ähnlichen Mengenverhältnissen von Watte und Wasser gefunden, daß dieses bereits durch einen Tropfen $^{n}/_{10}$-Lauge seinen Phenolphthaleinpunkt erreicht. Bei der Papierwatte und bei der Gaze, die keine Säure abgeben, fällt dieses Bedenken überhaupt weg. Es kann sich somit bei allen drei Sorten um eine echte Adsorption handeln. Die Adsorption tritt auch in Gegenwart von Eiweiß (Casein) ein; eine mit Phenolphthalein alkalisch reagierende Lösung wird durch die Verbandstoffe sofort entfärbt, und zwar nicht etwa wegen Phenolphthaleinadsorption. Die Adsorption bleibt nur in dem Falle aus, wenn der Verbandstoff (Watte) bis zu diesem Umschlagspunkte schon vorher mit Lauge gesättigt wurde.

Eiweißadsorption. Diese wurde mit sauren und alkalischen Caseinlösungen und mit Blutserum vorgenommen. Es

Tabelle II.

Adsorbens . . . g	0,01	0,10	2,0	0,5	0,5	0,5
Adsorbendum . .	2 ccm Blutserum	10 ccm 1 ‰ ige saure Caseinlösung	10 ccm 0,5 % ige saure Caseinlösung	10 ccm 1 % ige alkal. Caseinlösung	10 ccm 1 % ige peptisch verdaute Caseinlösung	10 ccm 1 % ige tryptisch verdaute Caseinlösung
Versuchszeit, Stdn.	3	6	17	6	6	6
	Refraktometer-Skalenteile					
Baumwollwatte .	6788	1784	1878	2172	2172	2132
Papierwatte . . .	6786	1783	1878	2170	2162	2136
Gaze	6786	1790	—	—	—	2132
Ohne Adsorption .	6788	1788	1873	2168	2168	2132

wurde außerdem untersucht, ob Eiweißspaltungsprodukte adsorbiert werden, indem eine peptisch bzw. tryptisch verdaute Caseinlösung mit dem Verbandstoff behandelt wurde. Die Eiweißbestimmungen wurden an den betr. Lösungen vor und nach der Adsorption refraktometrisch vorgenommen (Eintauchrefraktometer Pulfrichs). Eine stattgefundene Adsorption hätte zur Verdünnung der Eiweißlösung und Abnahme der Zahl der Refraktometerskalenteile führen sollen. Wie aus Tabelle II ersichtlich, ist es nie zu einer Eiweißadsorption gekommen; die Lösungen wurden in den Versuchen, in denen eine verhältnismäßig größere Verbandstoffmenge (0,5 bis 2,0 g auf 10 ccm Lösung) gebraucht wurde, eher mäßig eingedickt, vermutlich durch Aufsaugen von Wasser. Auch Eiweißspaltungsprodukte werden nicht adsorbiert.

Fermentadsorption. Von Fermenten wurden Pepsin und Trypsin in 1 $^0/_{00}$igen Konzentrationen untersucht.

Die betreffende Fermentlösung (10 ccm) wurde mit einer abgewogenen Menge von Verbandmaterial (0,10 g) zusammengebracht und unter mehrmaligem Umrühren längere Zeit hindurch (8 bis 10 Stunden) stehen gelassen. Die Bestimmung der Verdauungskraft wurde refraktometrisch ausgeführt, indem je 5 ccm der Flüssigkeit mit je 0,05 g eines Eiweißpulvers, in ein Wägegläschen vermischt, im Brutschrank der Verdauung ausgesetzt und nach Zentrifugieren die Refraktionszunahme der Flüssigkeit bestimmt wurde. Das Eiweißpulver wurde aus hitzegeronnenem Eiereiweiß gewonnen, das ausgetrocknet, fein zerrieben und durch ein feines Drahtsieb durchgesiebt wurde. Wenn man dafür sorgt, daß dieses Pulver mit der Flüssigkeit möglichst vollständig benetzt wird und die gleiche Verteilung durch mehrmaliges Umschwenken des Gläschens während der Verdauung sichert, so gibt diese Methode in Kontrollbestimmungen sehr gute Resultate. Der Berechnung der in Tabelle III angegebenen Prozentzahlen wurde die durch die vollständige Verdauung des Pulvers gewonnene Refraktion zugrunde gelegt und ermittelt, welcher Anteil des Gesamteiweißes verdaut wurde; für die Refraktion von einer 1 $^0/_0$igen Lösung dieses Pulvers wurden, wie beim Blutserum, 172 Einheiten der 5. Dezimale des Refraktionsindex angenommen.

Eine Fermentadsorption (s. Tabelle III) konnte in jedem Falle deutlich nachgewiesen werden, dies stimmt mit dem Befunde von Buchner und Klatte[1]) überein; in einem Falle war sogar die Pepsinadsorption vollständig. Ein

[1]) Diese Zeitschr. 9, 436, 1908.

Tabelle III.

Adsorbendum	10 ccm 1 ‰ige Pepsinlösung	10 ccm 1 ‰ige Pepsinlösung	10 ccm 1 ‰ige Trypsinlösung	10 ccm 1 ‰ige Trypsinlösung
Adsorbens . . . . g	0,1	0,1	0,1	0,1
Dauer der Adsorption, Stdn.	18	16	16	17
Dauer der Verdauung, Stdn.	6	4	5	17
	Nach erfolgter Adsorption wurden gelöst % des Gesamteiweißes (5 ccm Fermentlösung auf 0,05 g Eiweißpulver)			
Baumwollwatte	0	40	40,5	36,6
Papierwatte	0	28	40,5	45,8
Gaze	0	—	—	—
Ohne Adsorption	74,3	71	56	75,1

regelmäßiger Unterschied zwischen der Adsorptionsfähigkeit der Baumwollwatte und der Papierwatte konnte nicht aufgefunden werden; beide adsorbieren etwa gleich kräftig.

Eiweißverdauung in Gegenwart von Verbandstoffen. Diese Untersuchungen wurden an verdünnten sauren bzw. alkalischen Caseinlösungen unter Anwendung von Pepsin und Trypsin ausgeführt.

Je 50 ccm Caseinlösung wurden mit und ohne Verbandstoff (je 2 g) im Brutschrank verdaut. Nach Abbrechen des Versuches wurde das Casein der Volhardschen Methode[1]) entsprechend aus saurer Lösung direkt und aus alkalischer nach vorausgegangenem Ansäuern mit 20 ccm 20%iger Na_2SO_4-Lösung gefällt, nach einigem Stehen filtriert und je 50 ccm des Filtrats mit $^n/_{10}$-Lauge titriert, um die Menge der sauren Verdauungsprodukte zu bestimmen. Weitere Proben der Caseinlösung wurden mit und ohne Verbandstoff ohne Verdauung ähnlich behandelt, um den Ausgangspunkt festzustellen. Caseinlösungen mit nicht gewaschener Baumwolle verbrauchten etwas mehr Lauge als die Lösungen ohne Verbandstoff.

Wir haben eine größere Reihe dieser Versuche ausgeführt, weil wir bei der Beeinflussung der Verdauung auch stets auf die Säurenatur der Baumwolle achten mußten. Tabelle IV enthält die Ergebnisse von einigen dieser Versuche. Da es sich bei den Wundsekreten eher um ein tryptisches, d. h. in schwach alkalischem Milieu wirksames Enzym handelt, haben wir die tryptische Verdauung eingehender studiert. Wir sehen

[1]) Löhlein, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7.

Tabelle IV.

Versuchs-Nr. . .	I.[1]	II.[1]	III.[2]	IV.[3]	V.[3]	VI.[1]
Ferment . . .	0,1 ‰ige Trypsinlösung	0,1 ‰ige Trypsinlösung	0,1 ‰ige Trypsinlösung	1 ‰ige Tryps.-Lösung	0,01 ‰ig. Trypsinlösung	0,1 ‰ige Pepsinlösung
Substrat . . .	1 %ige alk. Caseinlösung	1 %ige alk. Caseinlösung	1 ‰ige alk. Caseinlösung	2 %ige alk. Caseinlösung	2 %ige alk. Caseinlösung	1 %ige saure Caseinlösung
Dauer der Verdauung, Stdn.	17	6	5	1,5	9	5
In Gegenwart von	Säurebildung pro 100 ccm Filtrat kcm $^n/_{10}$-Lauge					
Baumwollwatte	8,6	6,6	8,9	12,3	0,8	5,0
Gaze	—	—	9,6	—	—	4,4
Papierwatte . .	10,5	7,4	9,3	—	—	4,6
Ohne Verbandstoff	11,6	8,8	10,0	12,9	1,0	6,4

in sämtlichen Versuchsreihen, daß ohne Verbandstoff etwas mehr Säure gebildet wird als in Gegenwart desselben. Es ist somit die Frage, ob die Verbandstoffe die Verdauung überhaupt beeinflussen, bejahend zu beantworten: es findet eine Hemmung statt. Die zweite Frage, worauf diese Beeinflussung zurückzuführen ist, gewinnt hier mit Rücksicht auf die saure Natur der Baumwollwatte und auf die Laugenadsorption durch Verbandstoffe eine Bedeutung. Die tryptische Verdauung könnte namentlich durch Verminderung der Alkalinität allein beeinflußt werden, ohne daß es sich um eine Fermentadsorption handeln müßte.

Die Versuchsreihen der Tabelle IV, die sich auf die tryptische Verdauung beziehen, sind dreierlei: I. und II. sind Versuchsreihen mit Baumwolle ohne Vorbehandlung; in III. war die Baumwolle mit dest. Wasser mehrmals ausgewaschen, während in IV. und V. die Baumwolle in der oben angegebenen Weise mit Lauge vorbehandelt wurde. Aus den ersten zwei Versuchsreihen geht deutlich hervor, daß die Verdauung durch die An-

[1]) Mit nicht vorbehandelter Baumwollwatte.

[2]) Baumwollwatte mit Wasser ausgewaschen.

[3]) Baumwollwatte bis zum Phenolphthaleinpunkt des Waschwassers mit Lauge gesättigt (so lange Lauge hinzugesetzt, bis das Wasser mit Phenolphthalein alkalisch zu reagieren begann).

wesenheit der Verbandstoffe, und zwar vor allem Baumwolle, verzögert wird. Wird die Baumwolle ausgewaschen, so wirkt sie noch immer hemmend; dieselbe, jedoch weit geringere Wirkung ist vielleicht auch bei der mit Lauge vorbehandelten Baumwolle durch die Ausschläge gleicher Richtung angedeutet, obwohl diese zu einem sicheren Schlusse nicht berechtigen. Eine Verzögerung der Verdauung ist übrigens auch bei den anderen Verbandstoffen, und zwar auch bei der uns praktisch weniger interessierenden Papierwatte vorzufinden.

Die Vorbehandlung des Verbandstoffes (Baumwolle) hat also auf die Verdauungshemmung einen deutlichen Einfluß, man könnte trotzdem recht schwer entscheiden, welcher Anteil dieser Hemmung auf die Rechnung der durch die Baumwolle abgegebenen Säure, welcher auf die Rechnung der Laugenadsorption und welcher auf die der Fermentadsorption zu schreiben wäre. Die geringere Hemmung der ausgewaschenen und der mit Lauge vorbehandelten Baumwolle könnte die Vermutung nahelegen, daß das Wesen der Hemmung in der Verminderung der OH-Ionenkonzentration liegt. Wir sind aber über den Einfluß der OH-Konzentration auf den Verlauf der tryptischen Verdauung noch wenig orientiert[1]), und die vorliegenden Angaben deuten eher darauf hin, daß die Abnahme der OH-Konzentration im Laufe der Verdauung keine Hemmung derselben hervorruft. Anderseits ist durchaus nicht unwahrscheinlich, daß durch eine Vorbehandlung des Adsorbens, vor allem durch einen gröberen Eingriff, wie z. B. durch die Vorbehandlung mit Lauge, die Intensität der Adsorption beeinflußt wird[2]). Der Umstand, daß durch die Verbandstoffe auch die peptische Verdauung gehemmt wird (Kolonne VI), spricht eher für die Rolle einer Fermentadsorption. Wir wollen trotzdem dahingestellt lassen, auf welchen Umstand die antifermentative Wirkung der Verbandstoffe zurückzuführen wäre.

Bakterienadsorption. Sie wurde bereits durch Eisen-

---

[1]) Vgl. Euler, Allgemeine Chemie d. Enzyme S. 73.

[2]) So fand z. B. J. Sieger (Dissertation Budapest 1915), daß die Adsorptionsfähigkeit der Kohle gegenüber Fuchsin durch die Vorbehandlung mit HCl, Alkohol, Xylol, Petroläther usw. herabgesetzt wird. (Anmerkung bei der Korrektur.)

berg[1]) aus anderen Gesichtspunkten untersucht. Andere[2]) haben nur pulverige Adsorbentien verwendet.

Die Methode dieser Forscher bestand in der vergleichenden Bestimmung der Keimzahl einer Bakterienaufschwemmung vor und nach der Adsorption, wobei störende Manipulationen, wie das Filtrieren, nicht vermieden werden konnten. Da wir jedoch auch die Adsorptionsfähigkeit gerade des Zellstoffes zu bestimmen gesucht haben, mußte das Filtrieren unbedingt vermieden werden. Wir bestimmten die Durchsichtigkeit der betr. Bakterienaufschwemmung vor und nach der Adsorption, und zwar wurde dazu das Authenrieth-Königsbergersche Colorimeter herangezogen, das sich auch zu diesem Zwecke als vortrefflich brauchbar erwies.

Eine direkte Beurteilung der Durchsichtigkeitsdifferenzen ist mit dem Colorimeter, wie es zur Untersuchung farbiger Lösungen verwendet wird, nicht möglich. Wir haben uns deshalb folgendermaßen ausgeholfen: das Milchglas des Colorimeters, das zur Zerstreuung und Abdämpfung des einfallenden Lichtes dient, wird entfernt; anstatt diesem wird an der hinteren Seite der Kassette eine scharfe Druckschrift, womöglich in der Weise ausgespannt, daß auf die zwei Hälften des Gesichtsfeldes gleiche, komplizierter gebaute Buchstaben, z. B., „a" fallen. Das Papier muß durchscheinend und nur auf der einen Seite bedruckt sein. Manchmal, und zwar hauptsächlich bei Bestimmungen, die auf die dünneren Schichten des Colorimeters fallen, erweist sich das einfallende Licht noch immer zu stark; es kann jedoch zweckmäßig dadurch abgedämpft werden, daß das Colorimeter vor eine mit verdünnter Methylenblaulösung gefüllte planparallele Wanne gestellt wird. Mit verschieden verdünnten Farbstofflösungen läßt sich die gewünschte Lichtstärke leicht herstellen. Man vergleicht die Schärfe der Buchstaben in den beiden Gesichtsfeldern. Mit dieser Anordnung ergeben die Parallelablesungen sehr befriedigende Werte, da sie kaum um einen Skalenteil voneinander abweichen. Durch die Bestimmung der entsprechenden Skalenteile kann das Colorimeter für verschiedene Verdünnungen der Aufschwemmung geeicht werden, wodurch auch die prozentuale Adsorption zu berechnen ist.

Es wurde die Adsorption von Coli commune und Staphylococcus albus durch Baumwollwatte, Papierwatte und Gaze untersucht. Um dem natürlichen Ionenmilieu möglichst nahe zu kommen, wurde als Aufschwemmungsflüssigkeit eine Ringer-

---

[1]) Deutsche med. Wochenschr. 1918, 634.

[2]) Salus, diese Zeitschr. **84**, 1917. — Bechhold, Kolloid-Zeitschr. **23**, 35, 1918.

lösung gewählt. 0,5 g des Verbandstoffes wurden mit 5 ccm Bakterienaufschwemmung zusammengebracht, durchgemischt, 1/4 Stunde stehen gelassen, sodann der Verbandstoff mit einem Glasstabe tüchtig ausgepreßt, die Flüssigkeit wie oben beschrieben untersucht.

Es wurden adsorbiert aus einer Aufschwemmung von

	Coli %	Staphylococcus %
durch Baumwollwatte .	59; 45	56; 58
„ Papierwatte . .	45; 42	56; 56
„ Gaze	36; 38	39; 40

Die Doppelzahlen stellen Parallelversuche dar. Wir sehen, daß die Verbandstoffe Bakterien stark adsorbieren, und zwar ist die Adsorption durch die Baumwollwatte und Papierwatte etwa gleichen Grades, dagegen durch Gaze stets schwächer. Die Feststellung von Eisenberg (l. c.), daß grampositive Bakterien stärker adsorbiert werden als gramnegative, ist hier höchstens angedeutet. In der Pharmakodynamie der Verbandstoffe glauben wir der Bakterienadsorption eine gewisse Bedeutung zuschreiben zu müssen.

Toxinadsorption. Es stand uns derzeit nur das toxinähnliche Albuminoid Ricin zur Verfügung, dessen Wirksamkeit vor und nach der Adsorption an gewaschenen Rinderblutkörperchen gemessen wurde.

Die Ricinlösung wurde aus Ricinussamen mit physiologischer Kochsalzlösung bereitet. Den Ausgang bildete eine Verdünnung, die in einer Viertelstunde eine starke, jedoch nicht vollständige Agglutination hervorrief. Die Intensität der Agglutination konnte mit dem Authenrieth-Königsbergerschen Colorimeter beurteilt werden. Das Colorimeter wurde vor allem mit verschiedenen Verdünnungen der ursprünglich 3%igen und zu 1 : 10 mit n/10-HCl versetzten Blutkörperchenaufschwemmung geeicht. Sodann wurde die Kalibrierung für verschiedene Verdünnungen der Ricinlösung vorgenommen; die Ricinlösung und die Blutkörperchenaufschwemmung wurden zu gleichen Teilen gemischt, die Röhrchen dreimal umgekippt, 1/4 Stunde ruhig stehen gelassen, sodann filtriert; das Filtrat mit n/10-HCl 1 : 10 versetzt, untersucht. In derselben Weise wurden auch die einer Adsorption (1 g Verbandstoff auf 10 ccm Lösung) ausgesetzten Ricinlösungen behandelt.

Zur Beurteilung der Ergebnisse werden folgende Zahlen genügen:

Durch das Filtrieren allein werden zurückgehalten . . . . 26 % der Blutkörperchen,
agglutiniert werden durch die verwendete Ricinlösung . . . . 70 " " "
" werden nach Adsorption mit Baumwollwatte . . . 48 " " "
" werden nach Adsorption mit Papierwatte . . . . 50 " " "
" werden nach Adsorption mit Gaze . . . . 48 " " "

Andere Versuche lieferten ähnliche Zahlen. Demnach wird das toxinähnliche Ricin durch die Verbandstoffe deutlich, und zwar durch alle drei Verbandstoffsorten gleich stark adsorbiert.

Die Capillarität.

Neben der mechanischen Wirkung im engeren Sinne wird allgemein auf die Capillarität der Verbandstoffe Gewicht gelegt. Sie gewinnt im Lichte unserer Untersuchungen noch dadurch an Wichtigkeit, daß auch etwa ablaufende mechanische Wirkungen im weiteren Sinne (Adsorption) erst dann zustande kommen können, wenn sich die Wundsekrete mit dem Verbandstoff auf einer ausgedehnten Oberfläche berühren können, d. h. wenn sie aufgesaugt werden. Da die hier in Betracht kommenden Verbandstoffe durch Wasser oder physiologische Eiweißlösungen nicht aufquellen, so ist die Aufsaugung einzig und allein den capillaren Kräften, die durch das dichte Zusammenliegen der Fasern entstehen, zuzuschreiben.

Der nach der Aufsaugung bemessene Wert einer Baumwollwatte wird nach den Vorschriften des Arzneibuches dadurch bestimmt, daß dieselbe in ein mit Wasser gefülltes Gefäß geworfen wird und beobachtet, wie lange der Wattebausch auf der Oberfläche schwimmt. Ist das Vermögen, Flüssigkeiten aufzusaugen größer, so sinkt die Watte rascher zu Boden. Diese einfache Probe kann uns jedoch bei vergleichenden Prüfungen verschiedener Sorten kaum befriedigen, da es sich nur um Sekunden handelt und da bei ihr — wie R. E. Liesegang[1]) bemerkt — auch andere Momente, wie die Temperatur des Wassers, sich störend geltend machen. Man muß sich ferner stets an eine bekannte brauchbare Sorte anlehnen und erhält somit nur gelegentlich vergleichbare

---

[1]) Kolloid-Zeitschr. **16**, 18, 1915.

Werte. Um diese Unzulänglichkeiten auszuschalten, habe ich mich einer anderen Methode bedient. Ich habe die Wassermenge bestimmt, welche von 5 g des mit 100 ccm Wasser durchtränkten Verbandstoffes zurückgehalten wird. Die Durchtränkung wurde in einem weitem Becherglas unter mehrmaligem Auspressen des Verbandstoffes vorgenommen. Der ganze Inhalt wurde sodann unter vorsichtigem Vermeiden eines Druckes auf den Verbandstoff mit Hilfe eines Glasstabes auf eine weite Nutsche gebracht; das abfließende Wasser wird in einem Meßcylinder gesammelt und nach einer Minute abgelesen; es sei bemerkt, daß das überflüssige Wasser bereits in einer halben Minute fast vollständig abgelaufen ist, nachher fallen nur einige Tropfen in den Meßcylinder ab.

Auf die beschriebene Weise wurde gefunden, daß in Parallelversuchen je 5 g des Verbandstoffes folgende Wassermengen zurückhalten:

Friedenswatte	73;	73 ccm,
Kriegswatte	68;	70 „
Papierwatte	55;	52 „
Gaze	53;	53 „

Es zeigt sich somit mit befriedigender Übereinstimmung, daß zwischen der Capillarität der Friedenswatte und der Papierwatte ein erheblicher Unterschied vorliegt und daß die Capillarität der Gaze ebenfalls eine verhältnismäßig niedrige, etwa der der Papierwatte entsprechende ist. Was die Anwendbarkeit der Baumwollwatte der Papierwatte gegenüber anbelangt, so kommt es wahrscheinlich noch hinzu, daß sich die erstere der Wundoberfläche enger anschmiegt und dadurch die Entfaltung der an und für sich stärkeren capillaren Kräfte noch weiter begünstigt wird.

Diese Untersuchungen haben ermöglicht, manche alltäglichen Begriffe, wie die „Capillarität“ der Verbandstoffe, näher zu definieren, sodann manche der Chirurgie beliebte Ausdrücke, wie „antifermentative Wirkung“, auch auf die Verbandstoffe zu übertragen und dieselben genauer zu analysieren. Sie haben sodann ergeben, daß die Verbandstoffe durch ihre Adsorptionsfähigkeit auch in engerem Sinne pharmakologische Wirkungen entfalten können. Trotzdem reichen diese Versuche zu einer praktischen Bewertung der Resultate noch nicht aus. Die Hindernisse liegen zum größten Teil in den Mängeln unserer patho-physiologischen Kenntnisse über die Biologie der Wunden

und der Wundheilung. Wir sollten vor allem genau wissen, was zum Vorteil und was zum Nachteil dieser Vorgänge dient, um die zu entfernenden Stoffe wegzuschaffen und die Wirksamkeit der zu Belassenden zu fördern. Es werden zu diesem Zwecke auch genauere Kenntnisse über die einzelnen Infektionen notwendig sein. Erst wenn diese Bedingung erfüllt, können wir durch das eindringliche Studium der Adsorptionsverhältnisse, etwa durch Heranziehung einer „spezifischen Adsorption“, pharmakologisch zielbewußt eingreifen. Einstweilen haben wir bei den Verbandstoffen vor allem die Capillarität zu berücksichtigen, welche durch das angegebene einfache Verfahren leicht zu bestimmen ist, sodann ins Auge zu fassen, daß die Verbandstoffe nicht nur rein schützende, sondern durch die Hemmung der Eiweißkörperspaltung, durch die Bakterienadsorption, durch Adsorption von Toxinen auch direkt heilende Wirkungen ausüben können.

Die einzelnen Tatsachen lassen sich wie folgt beschreiben:

Von Farbstoffen wird das basische Methylenblau adsorbiert, das saure Indigocarmin dagegen überhaupt nicht. Kriegswaren, vor allem Papierwatte, adsorbieren stärker als aus reiner Baumwolle bestehende Friedenswaren; Gaze adsorbiert am schwächsten.

Säure wird deutlich nur von der Papierwatte adsorbiert, während Lauge durch alle untersuchten Sorten (Baumwollwatte, Papierwatte, Gaze) kräftiger aufgenommen wird. Baumwollwatte und Gaze stehen der Papierwatte nach.

Eiweiß (Casein und Blutserum) und Eiweißspaltungsprodukte werden von keiner der untersuchten Sorten adsorbiert.

Fermente (Pepsin und Trypsin) werden aus wäßriger Lösung adsorbiert. — Die Anwesenheit eines Verbandstoffes beeinflußt die peptische und tryptische Verdauung in hemmender Richtung. Es bleibt dahingestellt, inwieweit die vorliegende antifermentative Wirkung auf eine Fermentadsorption oder auf eine Laugenadsorption zurückzuführen ist.

Eine Bakterienadsorption (Coli und Staphylococcus) und eine Toxinadsorption (Ricin) ist deutlich nachzuweisen.

In der Adsorptionsfähigkeit der einzelnen Verbandstoffsorten bestehen oft erhebliche Unterschiede.

Es wurde schließlich die Capillarität der verschiedenen Sorten vergleichend bestimmt und gefunden, daß Papierwatte und Gaze diesbezüglich weit hinter der Baumwolle zurückstehen.

Die Wirkungsweise der Streupulver in physiologisch-chemischer Hinsicht.

Von

Alexander Belák.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 4. März 1919.)

In der vorangehenden Arbeit haben wir einige Gesichtspunkte in der Wirkungsweise der Verbandstoffe hervorgehoben. Anschließend an diese Untersuchungen schien es uns wünschenswert, auch die physikalische Wirkungsweise der Streupulver ins Auge zu fassen, um so mehr, als ein Teil derselben schwerlösliche oder unlösliche Verbindungen darstellt und somit in dieser Beziehung unseren auch in der Adsorptionstherapie oft gebrauchten Mitteln (Kohle, Bolus) nahesteht. Trotz dieser Eigenschaft wird in der Pharmakodynamie dieser Mittel immer nur die chemische Zusammensetzung und die mehr oder weniger sichergestellte Abspaltung von wirksamen Komplexen erwähnt.

Die von klinischer Seite hervorgehobenen Wirkungen der Streupulver[1]) sind etwa die folgenden: baktericide Eigenschaft granulationsfördernde, austrocknende und antifermentative Wirkung, jedoch sind diese Eigenschaften in den verschiedenen Pulvern ungleich ausgeprägt. Vom Wirkungstypus aus lassen sich, wenn man von den näher experimentell-biologisch schwach begründeten antifermentativen und granulationsfördernden Wirkungen absieht, zwei größere Klassen der Streupulver aufstellen, die jedoch zahlreiche Übergänge ineinander aufweisen; wir haben namentlich Stoffe, die vorwiegend baktericid, und solche, die

[1]) Näheres siehe z. B. bei Skutetzky-Starkenstein, Die neueren Arzneimittel usw., II. Aufl., Springer, Berlin 1914.

vorwiegend austrocknend wirken. Es soll diese Klassifizierung so verstanden werden, daß den Mitteln der ersten Klasse eine austrocknende Wirkung kaum zukommt, dagegen haben die Stoffe der zweiten Klasse stets auch eine mehr oder weniger ausgesprochene baktericide Eigenschaft; die Granulationsförderung ist zumeist der ersteren Klasse eigen. Es würde sich somit diese Einteilung damit decken, als wenn wir sagen würden: es gibt nicht austrocknende und austrocknende Streupulver. Es wird sich weiter unten zeigen, daß diese Einteilung gewissermaßen gerechtfertigt ist.

Wir haben nun mehrere Glieder dieser Gruppen auf ihre Adsorptionsfähigkeit untersucht. Es sei vor allem das nötige über diese Mittel vorausgeschickt:

Von den vorwiegend baktericiden Stoffen wurden untersucht Jodoform, Isoform, Jodol; von den vorwiegend austrocknenden Xeroform, Dermatol, Zinkoxyd, Kaolin. Jodoform ist in Wasser unlöslich. Isoform (Parajodanisol, zu gleichen Teilen mit phosphorsaurem Kalk gemischt) löst sich wenig in Wasser und Ringer. Gibt auch mit Säure kein freies J ab. Jodol (Tetrajodpyrrol) wasserunlöslich und löste sich auch in Ringer nur wenig; das Waschwasser unseres Präparates reagierte sauer, konnte aber durch Auswaschen säurefrei erhalten werden; die Untersuchungen wurden mit diesem säurefreien Pulver ausgeführt. J spaltet sich nach längerem Stehen mit Wasser ab. Xeroform ist ein Wismut-Brom-Phenolpräparat, ist in Wasser unlöslich, in einer Ringerlösung sehr wenig löslich. Dermatol ist ein Wismut-Gallussäurepräparat, wasser- und ringerunlöslich. Zinkoxyd ist wasser- und ringerunlöslich, dagegen war das Kaolin ein wenig in Ringer löslich. Chemisch wird also die erste Klasse durch J-Präparate vertreten, dagegen befinden sich in der zweiten (Jodoformersätze) Verbindungen verschiedenen Chemismus.

Die Farbstoffadsorption. Es wurde vor allem die Farbstoffadsorption mittels des Authenrieth-Königsbergerschen Colorimeters untersucht. Je 0,1 g der Substanz wurden mit 20 ccm der 0,15 $^0/_0$ igen Farbstofflösung zusammengebracht, gleichmäßig geschüttelt und nach Zentrifugieren mit folgendem Ergebnis untersucht:

Es wurden adsorbiert:

	aus Methylenblau %	aus Indigocarmin %
durch Jodoform	1	0
„ Isoform	3	7
„ Jodol	16	8

	aus Methylenblau %	aus Indigocarmin %
durch Xeroform	37	8
„ Dermatol	8	0
„ Zinkoxyd	5	9

Zwischen dem Wirkungstypus und der Farbstoffadsorption konnte somit kein Zusammenhang aufgefunden werden. Mit der Ausnahme vom Jodol und Xeroform ist die Farbstoffadsorption überhaupt geringen Grades.

Die Eiweißadsorption. Die betreffende Eiweißlösung (Blutserum und eine saure Caseinlösung) wurde mit den Pulvern zusammengeschüttelt, zentrifugiert und die Eiweißlösung vor und nach der Adsorption mit dem Pulfrichschen Eintauchrefraktometer untersucht. Zur Kontrolle der Löslichkeit wurde auch eine Serie mit Ringerlösung aufgestellt.

Die Ergebnisse sind in der beigegebenen Tabelle aufgezeichnet. Der Unterschied zwischen den zwei vorerwähnten Klassen dieser Stoffe ist hier auffallend. Während wir unter den vorwiegend baktericiden Pulvern (Jodpräparate) nur an zwei Stellen eine Adsorption von Eiweiß auffinden können (Jodoform, Kolumne II, und Isoform, Kolumne I), ist bei den als vorwiegend austrocknend bezeichneten Stoffen eine mehr oder weniger ausgiebige Eiweißadsorption die Regel. Bei der

Tabelle

Streupulver	I.	II.	III.	IV.	V.
	2%ige saure Caseinlösung 1:25[1])	Blutserum 1:10	Blutserum 1:5	Blutserum 1:5	Ringerlösung 1:5
	Refraktometer-Skalenteile				
Jodoform	2494	5878	5623	5740	1851
Isoform	2158	5904	5615	5723	1912
Jodol	2495	5880	5590	—	1865
Xeroform	2392	5808	5458	5545	1870
Dermatol	2460	5839	5425	5575	1841
Zinkoxyd	1751	5827	5450	5550	1848
Kaolin	—	—	5443	5495	1875
Ohne Adsorption .	2487	5910	5563	5670	1856

[1]) 1 g des Pulvers auf 25, bzw. 10 und 5 ccm Flüssigkeit.

vorerwähnten Klasse finden wir häufig eine Zunahme der Refraktion der Flüssigkeit, es ist jedoch aus diesen Daten nicht zu entscheiden, ob dies auf eine Löslichkeit in der Eiweißlösung oder auf eine Eindickung derselben zufolge Wasseradsorption zurückzuführen ist. Wir gewinnen jedoch einen gewissen Einblick in diese Verhältnisse, wenn wir die Viscosität der behandelten Sera untersuchen: handelt es sich um eine Eindickung zufolge Wasseradsorption, so muß die Viscosität steigen, ist dagegen eine Auflösung des Mittels vorhanden, so wird dadurch, da es sich nicht um kolloide Stoffe handelt, die Viscosität nicht beeinflußt. Es wird dabei stillschweigend angenommen, daß keine Zustandsänderung des Serumeiweißes eintritt. Es haben sich nun folgende Zahlen ergeben:

	Refr.-Skalenteile	Ausflußzeit Sekunden
Serum ohne Zusatz	5991	347
„ mit Jodoform . . .	6057	346,5
„ „ Isoform	6074	346
„ „ Jodol	6055	346

Es ist also eher zu einer geringen Abnahme, als zu einer Vergrößerung der Viscosität gekommen und somit dürfen wir schließen, daß die Refraktionszunahme des Blutserums nicht zufolge einer Wasseradsorption, sondern durch die Auflösung der Stoffe im Serum hervorgerufen wird.

Um unsere Betrachtungen über Eiweißadsorption zu schließen, können wir feststellen, daß die Mittel, denen vorwiegend eine baktericide Eigenschaft zugeschrieben wird (Jodpräparate), keine Eiweißadsorption aufweisen, sie lösen sich dagegen im Blutserum wenig auf, und vielleicht ist gerade in diesem Umstande eine Vorbedingung ihrer Wirksamkeit zu erblicken. Demgegenüber adsorbieren die Stoffe, denen eine vorwiegend austrocknende Wirkung zukommen soll, ganz regelmäßig Eiweiß. Ob sich diese im Blutserum auflösen oder nicht, läßt sich durch diese Versuchsanordnung nicht entscheiden.

Die Austrocknung. Es sollte noch die Frage beantwortet werden, in welcher Beziehung die Eiweißadsorption und die austrocknende Wirkung stehen. Die Trockenlegung einer Wunde kann theoretisch auf zweierlei Weise vor sich gehen:

es könnte sich erstens um die Begünstigung der Verdunstung des bereits gebildeten Sekretes und zweitens um die Einschränkung der Sekretion handeln. Von diesen beiden Möglichkeiten ist einer Prüfung in vitro nur die Begünstigung der Verdunstung zugänglich.

Wir haben je 1 g der Pulver mit je 5 ccm Blutserum in gleichweiten und gleichhohen Wägegläschen zusammengebracht, mit einem Glasstabe gut vermischt, abgewogen, sodann im Brutschrank auf 24 Stunden einer Austrocknung ausgesetzt. Als Kontrollen dienten abgewogene Blutsera ohne Pulverzutat und Pulver ohne Serum. Im letzteren Falle konnte eine Verflüchtigung nie nachgewiesen werden.

Folgende Zusammenstellung orientiert über die Ergebnisse. Die Zahlen stellen Mittelwerte aus je zwei sehr gut übereinstimmenden Bestimmungen dar.

	Gewichtsverlust
5 ccm Blutserum ohne Zutat	1,42 g
5 ccm „ mit 1 g Jodoform . .	1,77 g
5 ccm „ „ 1 g Isoform . . .	1,78 g
5 ccm „ „ 1 g Xeroform . .	1,42 g
5 ccm „ „ 1 g Zinkoxyd . .	1,46 g

Es zeigt sich somit, daß die klinisch austrocknend wirkenden Pulver (Xeroform und Zinkoxyd) keinen Einfluß auf die Austrocknung in vitro ausüben, daß diese vielmehr durch die klinisch nicht austrocknend wirkenden Jodoform und Isoform beschleunigt wird. Wir sind den Gründen dieser letzteren Tatsache nicht nachgegangen, sondern haben uns mit dem Schlusse befriedigt, daß die Trockenlegung der Wunden nicht durch die Steigerung der Verdunstung des Sekretes hervorgerufen wird; es kann sich somit nur um eine sekretionsvermindernde Wirkung der genannten Stoffe handeln. Die Sekretionsverminderung kann ihren Grund nur in einer direkten (gerbenden) Wirkung auf die sezernierende Oberfläche haben. Eine solche ist jedoch auf rein physikalische Weise nicht vorzustellen, es muß vielmehr auf eine chemische Einwirkung gedacht werden, die anderseits mit der Frage in Zusammenhang steht, inwieweit unlösliche Stoffe eine chemische Wirkung entfalten können. Wir wollen jedoch hier auf diese Verhältnisse näher nicht eingehen.

Die Austrocknung durch Bolus wurde bereits von Megele[1]) unter-

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1899.

sucht. Er beschickte Stücke von Leber, Eier usw. mit größeren Mengen von Bolus, untersuchte die Gewichtsänderung derselben und fand, daß die Austrocknung in Bolus rascher vor sich ging und die Stücke von Leber auch vor einer Verfaulung geschützt blieben, während sich z. B. die in Gaze eingehüllten Stücke rasch zersetzten. Die Oberfläche der Leberstücke sah nach dem Versuche wie gegerbt aus. Diese Ergebnisse, die auf eine capillare Aufsaugung durch Bolus zurückgeführt werden, können aber mit den unsrigen nicht unmittelbar verglichen werden, da es sich hier um die Anwendung von so großer Menge von Pulver handelt, die in praxi sicherlich nie angewendet wird. Eine solche Menge kann außer der Beeinflussung der Oberfläche zweifellos auch capillare Wirkungen entfalten, solche kommen aber in unserem Falle und in der Klinik kaum in Betracht.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen läßt sich demnach in die folgenden Schlußsätze zusammenfassen:

Die Streupulver haben entweder eine vorwiegend bactericide oder eine vorwiegend austrocknende Eigenschaft in dem Sinne, daß den austrocknenden auch eine baktericide Wirkung eigen ist, nicht jedoch umgekehrt.

Farbstoffe werden im allgemeinen nur schwach angenommen und aus der Intensität der Farbstoffadsorption lassen sich die vorerwähnten Gruppen nicht charakterisieren.

Die Eiweißadsorption (Blutserum und Casein) ist nur den austrocknenden Pulvern eigen, bei den vorwiegend baktericiden überhaupt nicht nachzuweisen. Letztere lösen sich im Blutserum unter den gewählten Versuchsbedingungen (Schütteln mit der Flüssigkeit) ein wenig auf. Zwischen der austrocknenden Wirkung und der Eiweißadsorption besteht vermutlich ein Zusammenhang, der jedoch nicht in einer Begünstigung der Austrocknung des Sekretes, sondern in einer näher nicht erforschten Sekretionsverminderung besteht.

Über intravitale Leberautolyse passiv anaphylaktisierter Meerschweinchen.

Von

B. v. Fenyvessy und J. Freund.

(Aus dem hygienischen Institut der Universität Budapest. [Direktor: Prof. L. v. Liebermann].)

(Eingegangen am 15. April 1919.)

Die Untersuchungen, die hier mitgeteilt werden sollen, haben den Zweck, die interessanten Befunde von E. P. Pick und M. Hashimoto[1]) über die Leberautolyse sensibilisierter (anaphylaktischer) Meerschweinchen nach einer bestimmten Richtung zu ergänzen[2]). Wie bekannt, haben Pick und Hashimoto folgende wichtige Tatsachen festgestellt: Behandelt man Meerschweinchen parenteral mit geringen Mengen von artfremdem Eiweiß (Pferdeserum), so läßt sich nach einiger Zeit eine erhebliche Vermehrung der inkoagulablen Stickstoffverbindungen im Verhältnis zum Gesamtstickstoffe in der Leber (weniger ausgesprochen oder gar nicht in anderen Organen) nachweisen. Diese Erscheinung, die die Autoren als Steigerung der intravitalen Leberautolyse bezeichnen, beginnt etwa am 3. Tage nach Zufuhr des artfremden Eiweißes, nimmt von da an bis zum 14. bis 16. Tage zu und klingt dann sehr allmählich ab; stimmt also in ihrem zeitlichen Verlauf mit dem der aktiven Überempfindlichkeit der vorbehandelten Meerschweinchen.

Diese Übereinstimmung im Verlauf der beiden Erscheinungen (Autolyse und Shockempfindlichkeit) legt den Gedanken

---

[1]) Pick und Hashimoto, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **76**, 1914.

[2]) Unsere Versuche sind zum größten Teil bereits vor dem Kriege ausgeführt worden.

nahe, daß die bei der intravitalen Leberautolyse freigewordenen Eiweißabbauprodukte für die Entstehung des anaphylaktischen Shocks verantwortlich sind. Doch lehnen Verff. diese Annahme auf Grund ihrer Versuche an entmilzten Tieren ab. Sie haben nämlich gefunden, daß die Exstirpation der Milz das Auftreten der erhöhten Leberautolyse an sensibilisierten Tieren verhindert, während die Shockempfindlichkeit ungestört zum Vorschein kommt. Daraus schließen Pick und Hashimoto einerseits, daß die Beeinflussung der Leberautolyse durch die Milz vermittelt wird, andererseits aber, daß die beiden Erscheinungen (Autolyse und Überempfindlichkeit) nur parallele Folgeerscheinungen derselben Ursache sind, daß aber eine gegenseitige Abhängigkeit zwischen beiden nicht besteht. Alle obigen Feststellungen, sowie manche andere, bezüglich der wir auf das Original verweisen möchten, sind an aktiv anaphylaktischen Meerschweinchen gewonnen worden. Es war daher von Interesse, nachzusehen, wie diese Verhältnisse bei der passiven Anaphylaxie liegen.

Die Wiederholung der Versuche von Pick und Hashimoto an passiv anaphylaktischen Tieren war für uns deshalb von besonderem Interesse, weil wir uns bereits in einer früheren Arbeit[1]) eingehend mit dem Mechanismus der passiven Anaphylaxie befaßt, insbesondere das Verhalten des anaphylaktischen Antikörpers im Blute quantitativ verfolgt und parallel damit den zeitlichen Verlauf der Überempfindlichkeit beschrieben haben. Auf Grund dieser Versuche haben wir uns für die celluläre (histogene) Auffassung der Anaphylaxie entschieden.

Der Gang unserer nachstehenden Untersuchungen war im Wesentlichen derselbe, den Pick und Hashimoto vorgezeichnet haben; nur mit dem Unterschied, daß wir die Tiere anstatt aktiv, passiv anaphylaktisiert haben.

Für die Herstellung der passiv anaphylaktisierenden Sera, sowie für die Prüfung und Dosierung waren uns die in unserer zitierten Arbeit mitgeteilten Erfahrungen und Methoden maßgebend. In der Mehrzahl der Fälle verwendeten wir das Serum von mit Eiereiweiß sensibilisierten Meerschweinchen, in einer

---

[1]) Fenyvessy und Freund, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Ther. 22, 1914.

geringeren Anzahl der Fälle das Serum von gegen Eiereiweiß oder Pferdeserum anaphylaktisch gemachter Kaninchen. Für den Ausfall der Versuche war die Herkunft der sensibilisierenden Sera gleichgültig, so daß wir hierauf im weiteren nicht zurückzukommen brauchen.

Das sensibilisierende Vermögen der Sera wurde in entsprechenden Versuchen quantitativ ermittelt und den eigentlichen Versuchstieren zumeist das Doppelte der minimal wirksamen Dosis intravenös einverleibt. Dann wurden die Tiere nach verschiedenen, in den Protokollen angegebenen Zeitpunkten durch Halsschnitt möglichst vollständig entblutet. Die anämische Leber wurde sofort herausgenommen, von den Ligamenten und der Gallenblase befreit und im übrigen ganz genau nach der von Pick und Hashimoto beschriebenen Weise verarbeitet. Die nach der Enteiweißung mit Essigsäure und Kochsalz erhaltenen Filtrate wurden mit Sulfosalicylsäure geprüft und nur solche von negativem Befund zur Stickstoffbestimmung verwendet. Die benützten Meerschweinchen wogen 300 bis 400 g.

Im folgenden möchten wir die Resultate unserer Versuche der Kürze halber tabellarisch mitteilen.

Tabelle I.

Untersuchung der Leber von normalen Meerschweinchen.

Versuchs-Nr.	Gesamt-N in 1 g Leberbrei mg	Inkoagulabl. N in 1 g Leberbrei mg	Verhältnis des nichtkoagulablen N zu dem Gesamt-N %
7	31,0	6,0	19,3
12	30,3	5,8	19,1
25	27,6	3,9	14,4
31	23,86	4,5	18,9
32	38,75	6,85	17,7
33	35,75	6,54	18,3

Auffallend ist in dieser Tabelle, daß unsere Normalwerte für inkoagulablen Stickstoff, somit auch die Verhältniszahlen — inkoagulables N : Gesamt-N (14,4 bis 19,3, im Mittel 18,1) weit höher liegen als diejenigen von Pick und Hashimoto (etwa 8 %). Den Grund für diese Abweichung können wir

nicht angeben; im übrigen möchten wir bemerken, daß diese von uns gefundenen Zahlen in dem Bereiche derjenigen liegen, die von Schlesinger[1]) bei normalen Kaninchenlebern (15 bis 20 %) und von Pick und Hashimoto für Mäuseleber (17,5 bis 18 %), sowie von denselben Autoren für die übrigen untersuchten Organe (Niere 20 %, Milz 23 %, Gehirn 19,9 %) gefunden worden sind.

Tabelle II.

Untersuchung der Leber aktiv anaphylaktischer Meerschweinchen.

Versuchs-Nr.	Tage nach der Sensibilisierung	Chok bei dem Kontrolltier auslösbar?	Gesamt-N in 1 g Leberbrei mg	Nichtkoagulables N in 1 g Leberbrei mg	Verhältnis des nichtkoagulablen N zu d. Gesamt-N %
3	14	Nein	38,5	5,4	18,8
6	17	„	23,75	4,55	19,1
14	15	Ja	33,2	8,26	24,9
15	16	„	33,4	8,0	24,0

Diese Versuche haben wir zu Beginn unserer Untersuchungen ausgeführt, um das Phänomen einmal selbst zu beobachten. Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigen die beiden letzten Versuche (Tier Nr. 14 und 15) tatsächlich eine Vermehrung des inkoagulablen N im Verhältnis zum Gesamtstickstoff, während bei den Tieren (Nr. 3 und 6) das nicht zu beobachten war. Nun müssen wir bemerken, daß diese 2 Paare von Tieren zwei verschiedenen Versuchsserien angehören. Die Tiere Nr. 3 und 6 gehören einer Gruppe, bestehend aus 4 Meerschweinchen an, die zur selben Zeit mit je 0,3 ccm Pferdeserum vorbehandelt wurden, während die Tiere Nr. 14 und 15 einer anderen Gruppe (4 Tiere) angehören, die mit je 0,3 ccm Eiereiweiß sensibilisiert worden sind. Je ein Tier von diesen beiden Gruppen wurde dazu verwendet, um die Überempfindlichkeit der Reinjektion des Antigens (am 15. Tage) nachzuweisen. Es zeigte sich nun, daß das Tier aus der Gruppe der Meerschweinchen Nr. 3 und 6 auf die Reinjektion mit nur unbedeutenden Vergiftungserscheinungen reagierte, während das Kontrolltier aus der zweiten Gruppe unter den typischen anaphylaktischen Vergiftungserscheinungen starb.

[1]) Schlesinger, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 1904.

Wir möchten auf diese Beobachtung später noch zurückkommen und diesmal nur bemerken, daß nach Ausfall der Reinjektion die beiden Tiere 14 und 15 hinreichend, während die Tiere Nr. 3 und 6 nur schwach sensibilisiert waren.

Tabelle III.

Untersuchung der Leberautolyse an passiv anaphylaktisierten Meerschweinchen.

Versuchs-Nr.	Stunden nach der passiven Sensibilisierung	Gesamt-N in 1 g Leberbrei mg	Inkoagulables N in 1 g Leberbrei mg	Verhältnis des inkoagulablen N zu d. Gesamt-N %
21	8	29,0	6,7	23,0
18	15	30,7	12,1	39,4
1	22	27,85	7,95	28,6
2	22	30,0	8,24	27,45
26	24	31,9	8,9	27,60
20	48	31,0	9,7	32,0
24	52	28,3	4,74	16,7
11	64	33,1	6,1	18,4

Von den in der Tabelle III angeführten Tieren erhielten Nr. 1 und 2 1,2 ccm eines Pferdekaninchen-Antiserums, dessen geringste anaphylaktisierende Dosis 0,5 bis 0,6 ccm betrug; alle übrigen wurden mit 0,7 ccm eines Eiereiweißkaninchen-Antiserums (minimale wirksame Dosis: 0,3 ccm) vorbehandelt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich, bewirkt die passive Anaphylaxie, also die intravenöse Einführung eines sensibilisierenden Serums, eine erhebliche Steigerung der Leberautolyse ähnlich, jedoch vielleicht noch prägnanter, wie dies bei der aktiven Anaphylaxie von Pick und Hashimoto nachgewiesen wurde. Bereits 8 Stunden nach der Injektion ist eine geringe Erhöhung der Verhältniszahl (inkoagulables N : Gesamt-N) zu konstatieren. Leider verfügen wir nicht über Versuche aus einem noch früheren Stadium. Da aber die Verhältniszahl (23,0%) auch hier nur noch unbedeutend erhöht ist und die Autolyse nach Maßgabe der späteren Bestimmung im Anstieg begriffen ist, so glauben wir annehmen zu dürfen, daß der Prozeß ungefähr zu dieser Zeit, also um die 8. Stunde bemerkbar wird. Die Autolyse steigt dann rapid an, zeigt noch in der 48. Stunde recht hohe Werte, um von der 52. Stunde

zu verschwinden und normalen Zahlen Raum zu geben. Dieser zeitliche Verlauf der Erscheinung steht im besten Einklang mit jener Kurve, die wir für die Entwicklung und Ablauf des anaphylaktischen Zustandes bei der passiven Sensibilisierung in unserer früheren Arbeit ermittelt haben. Auch die Empfindlichkeit tritt erst etwa zwischen der 7. bis 11. Stunde in Erscheinung, um nach einer Kulmination in wenigen Tagen wieder zu verschwinden. Somit scheint auch hier bezüglich des zeitlichen Verlaufs einerseits der Autolyse, andererseits der Überempfindlichkeit ein Parallelismus zu bestehen, so wie das bei der aktiven Anaphylaxie der Fall ist.

Wir möchten hier besonders hervorheben, daß sämtliche Tiere, die in der obigen Tabelle angeführt sind, in hohem Grade sensibilisiert waren, soweit dies aus der prompten Wirkung der Reinjektion an den nach 20 bis 24 Stunden reinjizierten Kontrolltieren geschlossen werden darf. (Die Leber dieser im Shock eingegangenen Tiere wurde nicht analysiert.) Es ist daher von Interesse, folgende Tabelle zu betrachten:

Tabelle IV.

Versuchs-Nr.	Stunden nach der passiven Sensibilisierung	Gesamt-N in 1 g Leberbrei mg	Inkoagulables N in 1 g Leberbrei mg	Verhältnis des nichtkoagulablen N zu dem Gesamt-N %
34	12	31,0	6,5	21,0
35	24	25,0	6,0	24,0
36	37	30,6	7,5	24,5

Diese Versuche wurden mit 2,2 ccm eines Eiereiweiß-Meerschweinchenantiserums ausgeführt. Die verwendete Serumdosis genügte nicht, um die Tiere zum tödlichen Shock zu präparieren. Bei der Reinjektion zeigte das Kontrolltier zwar deutliche anaphylaktische Symptome (Temperatursturz, Zuckungen) erholten sich aber bald. Somit liegt hier eine Überempfindlichkeit geringeren Grades vor. Wie sich aus der Tabelle ergibt, ist die Leberautolyse zwar auch hier nachweisbar (21,0, 24,0 bzw. 24,5 %) gegenüber dem Normalwert 18,1 %, der jedoch in geringerem Grade als in der obigen Tabelle III überschritten wird. Somit scheint die Leberänderung mit der Überempfindlichkeit nicht nur zeitlich parallel, sondern auch quantitativ proportional

zu gehen. Eine geringere Überempfindlichkeit geht mit einer geringeren Leberautolyse einher. Wir erinnern hier an die in Tabelle II angeführten Versuche an aktiv anaphylaktischen Tieren, die ebenfalls zeigen, daß die Leberautolyse trotz vorheriger Behandlung mit fremdem Eiweiß ausbleibt, wenn es nicht zu voller Überempfindlichkeit gekommen ist.

Endlich enthält nachstehende Tabelle die notwendigen Kontrollversuche, bei denen den Tieren anstatt eines sensibilisierenden Serums je 1,2 ccm normales Kaninchenserum intravenös injiziert wurde.

Tabelle V.

Versuchs-Nr.	Stunden nach der Injektion des Normalserums (Kanin.-Ser.)	Gesamt-N in 1 g Leberbrei mg	Inkoagulables N in 1 g Leberbrei mg	Verhältnis des inkoagulablen N zu d. Gesamt-N %
5	20	36,9	6,5	17,6
9	23	32,5	6,5	19,5
30	24	25,9	4,2	16,3

Die Tabelle zeigt dieselben Werte, die wir an normalen Meerschweinchen ermittelt haben. Somit ist das artfremde Normalserum innerhalb 24 Stunden ohne jede Wirkung auf die Leberautolyse, womit erwiesen ist, daß die an den eigentlichen Versuchstieren beobachtete Steigerung der Leberautolyse in der Tat den besonderen Eigenschaften bzw. Bestandteilen der sensibilisierenden Sera zuzuschreiben ist. Ob nun diese Bestandteile (Antikörper?), die die Leberänderung hervorrufen, mit denjenigen, die die Überempfindlichkeit bedingen, identisch sind, läßt sich durch diese Versuche nicht mit Bestimmtheit entscheiden, obwohl der zeitliche und quantitative Parallelismus der beiden Erscheinungen sehr für eine solche Annahme spricht.

Bezüglich der Bedeutung der Autolyse für die Überempfindlichkeit sind Pick und Hashimoto, wie oben erwähnt, zu dem Schlusse gekommen, daß sie nur unter dem Einflusse eines gemeinsamen Agens entstandene, jedoch voneinander unabhängige Erscheinungen sind. Als entscheidendes Argument hierfür betrachten Verfasser das Verhalten der entmilzten Tiere. Bei der aktiven Sensibilisierung wird die Steigerung

der Leberautolyse durch die Entfernung der Milz verhindert, bzw. wenn sie bereits bestanden hat, zum Schwinden gebracht, während die Überempfindlichkeit sich ungestört entwickelt.

Die Resultate der Leberanalysen sind in nachstehender Tabelle enthalten. Es sei bemerkt, daß die Entfernung der Milz ohne Komplikation gelungen ist; die intravenöse Einspritzung der sensibilisierten Sera wurde 24 Stunden nach der Operation vorgenommen und die Tiere in den angeführten Zeiträumen nach der Sensibilisierung getötet. Wir haben in entsprechenden Versuchen auch für die passive Anaphylaxie konstatiert, daß die Entfernung der Milz keinen Einfluß auf die Überempfindlichkeit hat. Die Versuche über die Leberautolyse sind in der Tabelle VI enthalten. Eines der hier angeführten Tiere (Nr. 28) diente zur Kontrolle und wurde nicht sensibilisiert, sondern 24 Stunden nach der Entfernung der Milz entblutet. Die übrigen 4 Tiere wurden 24 Stunden nach der Operation mit der doppelten Dosis eines sensibilisierenden Serums anaphylaktisiert und nach weiteren 25 Stunden entblutet.

Tabelle VI.

Untersuchung der Leber entmilzter und passiv anaphylaktischer Meerschweinchen.

Versuchs-Nr.	Stunden nach der passiv. Anaphylaktisierung	Gesamt-N in 1 g Leberbrei mg	Inkoagulables N in 1 g Leberbrei mg	Verhältnis des inkoagulablen N zu dem Gesamt-N %
22	24	32,8	5,1	15,6
23	24	34,2	5,6	16,6
27	25	29,5	6,4	21,7
29	$19^{1}/_{2}$	31,2	4,4	14,2
28	Kontrolle (ohne Sensibil.)	28,3	4,5	15,9

Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigt das Kontrolltier (entmilzt, jedoch nicht sensibilisiert) sowie 3 von den eigentlichen Versuchstieren (entmilzt und nachher sensibilisiert) in bezug auf Leberautolyse ähnliche, eher etwas niedrigere Zahlen, wie wir an normalen Tieren gefunden haben; nur bei einem einzigen (Nr. 27) ist die Verhältniszahl inkoagulables N : Gesamt-N um ein geringes erhöht. Somit sind auch diese

unsere Versuche in voller Übereinstimmung mit demjenigen von Pick und Hashimoto, indem sie zeigen, daß die Steigerung der Leberautolyse durch die Entfernung der Milz bei der passiven Anaphylaxie ebenso verhindert wird, wie dies Pick und Hashimoto an aktiv anaphylaktischen Tieren gefunden haben. Wenn wir weiter den Versuch Nr. 27 überhaupt berücksichtigen wollen, so können wir darin eine Bestätigung der Ansicht von Pick und Hashimoto erblicken, wonach die Milz in ihrer hier festgestellten Rolle bis zu einem gewissen Grade durch andere Organe ersetzt werden kann.

Zusammenfassung und Schlußbetrachtungen.

In den oben mitgeteilten Untersuchungen haben wir die Versuche von Pick und Hashimoto über die Steigerung der Leberautolyse bei der aktiven Anaphylaxie in ihren wichtigsten Punkten an passiv sensibilisierten Meerschweinchen wiederholt und bestätigt, indem wir gefunden haben:

1. daß die Leberautolyse auch durch die passive Sensibilisierung eine erhebliche Steigerung erfährt.

2. Diese Steigerung der Leberautolyse zeigt einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie die Shockempfindlichkeit der passiv anaphylaktisierten Tiere. Auch quantitativ scheinen Leberautolyse und Shockempfindlichkeit parallel zu gehen.

3. Die Entfernung der Milz verhindert die Steigerung der Leberautolyse bei der passiven Anaphylaxie ebenso wie bei der aktiven, während die Überempfindlichkeit zustande kommt.

4. Hervorheben möchten wir noch, daß nach unseren Versuchen die Leberautolyse ebensogut durch das Serum gegen Eiereiweiß als gegen Pferdeeiweiß sensibilisierter Tiere hervorgerufen wird. Somit hat diese Organveränderung nichts Artspezifisches.

Aus Punkt 3 und 4 folgt also, trotz des in Punkt 1 und 2 festgestellten zeitlichen und quantitativen Zusammenhangs der beiden Erscheinungen, daß die Leberveränderung wenigstens vorläufig für die Erklärung des Wesens insbesondere der Spezifizität nicht verwertet werden kann.

Bezüglich der Erklärung der beobachteten Erscheinung:

Die von Liebermann[1]) entwickelte Auffassung wird in ihrem Wesen durch die Konstatierung von gewissen Organveränderungen (in diesem Falle der Leberautolyse) nicht alteriert, sie bedarf nur der Ergänzung, daß das Toxogenin, indem es an die Organe gebunden wird, daselbst schon in unverändertem Zustande, also vor dem Freiwerden des Anaphylatoxins, die beobachteten Wirkungen entfaltet, die aber mit dem anaphylaktischen Chok nicht in unmittelbarem Zusammenhang stehen. Für den letzteren bliebe weiter das Freiwerden des Toxins aus dem Toxogenin unter dem Einfluß des Antigens verantwortlich.

---

[1]) L. v. Liebermann, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Ther. 21, 1914.

Uromelanin und Uromelanogen.

Von

Fritz Herzog und Heinrich Zeller.

(Aus der Medizinischen Klinik Greifswald.)

(Eingegangen am 5. Mai 1919.)

Vor einiger Zeit haben Feigl und Querner eine Arbeit über Melanurie veröffentlicht, in der sie die bisherige Literatur mit ihren eigenen Ergebnissen zusammenstellen. Sie suchen nach einer charakteristischen Reaktion für die echte Melanurie und glauben, sie in der Thormählenschen Reaktion, auch bei grünem Farbenausfall, gefunden zu haben, in Zweifelsfällen durch Belastung mit Tryptophan.

Ein Fall von ausgedehntem Lebertumor mit Melanurie gab uns Gelegenheit, die Untersuchung fortzusetzen.

Es handelt sich um einen 47 jährigen Patienten R., der im Februar 1919 in der Medizinischen Klinik aufgenommen wurde. Im Jahre 1907 war er in der hiesigen Augenklinik in poliklinischer Behandlung; damals schon wurden Befunde, die auf Tumorbildung im Bulbus des linken Auges schließen ließen, festgestellt und jetzt wieder bestätigt. 1915 trat völlige Erblindung auf diesem Auge ein. Seit Anfang 1918 bemerkt Pat. eine Schwellung der Leber, wegen der er sich nun in Behandlung begeben hat. — Befund: Allgemeiner Ernährungszustand reduziert. Leber: sehr stark vergrößert. Grenzen: Lungen-Leber-Grenze rechts, 5. Rippe; untere Lebergrenze von der Spina iliaca a. s. — zum Ansatz der 9. Rippe am Rippenbogen links. Konsistenz fest, zahlreiche Knoten von Kindskopf- bis Wallnußgröße zu fühlen. Im übrigen ist außer einer geringen Schwellung der Lymphdrüsen der linken Schlüsselbeingegend und geringer Bronchitis kein wesentlicher Organbefund feststellbar. Urinbefund s. u. — Diagnose: Maligner melanotischer Tumor vom linken Auge ausgehend mit Metastasenbildung in der Leber.

Der Urin wurde hellbraun bis dunkelbraun entleert, dun-

kelte meistens nach längerem Stehen nach, so daß er tiefschwarz aussah; auf Zusatz von Eisenchlorid wurde er tiefschwarz. Er gab die Thormählensche Reaktion; Diazo, Urobilinogenreaktion war häufig positiv, Indigorot wurde nachgewiesen. Eiweiß trat in einigen Urinen in Spuren auf. Sediment: o. B.

Wir versuchten zuerst, das Melanin zum Vergleich im Colorimeter darzustellen nach Umwandlung des Chromogens. Versuche mit Bariumchlorid, Bariumhydroxyd und neutralem essigsauren Blei mißlangen, da das Gesamtmelanin nur zum kleinen Teil auszufällen war. Später fanden wir, daß das durch Eisenchlorid umgewandelte Chromogen beinahe nicht ausfällbar ist.

Um über die Melanine mehr Einsicht zu bekommen, bestimmten wir die Stickstoffverteilung im Urin, da die Melanine sich aus dem Eiweiß herleiten. Gleichzeitig wurde Melanin und Gesamtmelanin bestimmt. Tabelle I bis III gibt die gefundenen Werte.

Trotz des großen Lebertumors ist die Harnstoffbildung beinahe normal, dagegen sind die Aminosäuren erhöht, obgleich bei dem Kranken keine Kachexie besteht. Die Peptide werden nur in geringen Mengen ausgeschieden; an einigen Tagen er-

Tabelle I.

Stickstoff in g.

Datum	Gesamt-N	Harnstoff-N	Ammoniak-N	Amino-N	Amino + Peptid-N	Kreatinin-N	Melanin	Gesamt-melanin	Thor-mählen	Menge	Spez. Gewicht
23. II.	5,85	4,46	0,24	0,26	0,26	0,42	45	1200	stahlblau	600	1035
23. II.	8,78	5,78	0,18	1,03	1,20	0,89	72	1320	stahlblau	950	1040
25. II.	6,67	4,37	0,15	0,41	0,85	0,62	144	150	grün	550	1034
26. II.	6,19	4,68	0,08	0,38	0,43	0,65	55	1040	stahlblau	450	1022
27. II.	9,60	7,86	0,02	0,69	0,84	0,74	91	1240	stahlblau	600	1040
28. II.	8,18	6,32	0,12	0,70	0,81	0,74	75	1320	stahlblau	750	1040
1. III.	7,78	6,39	0,21	0,29	0,54	0,56	49	800	blau	600	1032
2. III.	14,02	10,89	0,66	0,41	0,43	0,83	61	1300	stahlblau	750	1023
3. III.	9,08	7,24	0,62	0,36	0,39	0,67	52	820	blau	600	1030
4. III.	6,15	4,58	0,40	0,21	0,35	0,67	44	680	blau	600	1023
5. III.	—	—	0,25	0,21	0,60	0,60	47	160	blau	550	1031
6. III.	—	—	0,18	0,31	0,72	0,56	140	180	grün	1000	1030
7. III.	—	—	0,33	0,22	0,59	0,76	117	380	grün	400	1030

Tabelle II.

Prozentuale Ausscheidung.

Datum	Harnstoff	Ammoniak	Aminosäuren	Aminosäuren + Peptide	Kreatinin	Unbestimmter N	Amino : Amino + Peptid	Gesamtmelanin : 20 × Melanin
23. II.	76,2	4,1	4,4	4,4	7,1	8,2	1,0	1,3
24. II.	65,8	2,0	11,7	13,7	10,1	6,4	0,9	1,0
25. II.	65,5	2,2	6,1	12,8	9,3	10,9	0,5	0,1
26. II.	75,6	1,1	6,1	7,0	10,5	5,8	0,9	1,0
27. II.	81,9	0,2	7,2	8,8	7,7	2,4	0,8	0,7
28. II.	77,2	1,5	8,5	10,0	1,0	2,3	0,9	0,9
1. III.	82,1	2,7	3,7	4,4	7,3	3,5	0,9	0,9
2. III.	77,6	4,7	3,0	3,1	5,9	8,7	1,0	1,0
3. III.	79,7	6,9	4,0	4,3	7,5	1,4	0,9	0,8
4. III.	74,5	6,5	3,6	5,8	10,9	2,3	0,6	0,8
5. III.	—	—	—	—	—	—	0,3	0,2
6. III.	—	—	—	—	—	—	0,4	0,1
7. III.	—	—	—	—	—	—	0,4	0,2

Tabelle III.

Datum	Menge	Spez. Gewicht	Melanin	Gesamtmelanin	Thormählen	Kreatinin
8. III.	750	1030	29	160	grün	—
9. III.	550	1030	75	140	grün	—
10. III.	750	1018	194	180	grün	0,63
11. III.	1100	1027	62	220	grün	0,60
12. III.	550	1029	57	140	blau	0,62
13. III.	650	1030	134	200	grün	0,83
14 III.	750	1032	95	300	grün	0,65
15. III.	730	1030	120	130	grün	0,62
16. III.	550	1029	49	140	grün	0,80
17. III.	550	1031	30	160	grün	0,46
18. III.	500	1030	34	160	grün	0,57
19. III.	750	1031	83	200	grün	0,85
20. III.	850	1027	45	—	blau	0,81
21. III.	750	1028	25	100	blau	0,81
22. III.	600	1031	45	—	blau	0,68
4. IV.	750	1028	48	1240	stahlblau	—
5. IV.	500	1031	60	1300	stahlblau	—
6. IV.	500	1032	75	1120	stahlblau	—

reichen sie die Werte der Aminosäuren. Das Merkwürdige dabei ist, daß in diesen Tagen das Melanogen beinahe verschwunden ist. Es besteht also zwischen den Peptiden und den Melaninen eine bestimmte Beziehung. Eigenartig ist, daß nach Röntgenbestrahlung die Peptidvermehrung und die Melanogenverminderung für längere Zeit einsetzt und erst vierzehn Tage nach der zweiten Bestrahlung aufhört.

Am meisten interessiert das Verhalten der Thormählenschen Reaktion. Sie tritt in verschiedenen Farbgebungen auf: stahlblau, blau wie Berlinerblau, grünblau wie Kupfersulfat. Die Übergänge von einer Farbe zur anderen sind meistens schroff, so daß es nicht möglich war, mit einem Colorimeter die Farbgebung zu vergleichen. Je nach der Menge des Melanogens wechselt stahlblau und blau. Über 1000 wird die Reaktion stahlblau, unter 1000 blau. Bei geringem oder fehlendem Melanogengehalt wird die Reaktion hellblaugrün, sie kann aber auch bei fehlendem Melanogen blau sein.

Die Beziehungen von Melanogen und Thormählen klärt die Tabelle IV auf. Ist im Urin Melanin allein (nach der Röntgenbestrahlung), so fällt die Reaktion grün aus. Wird das Melanin durch Barium ausgefüllt (Melanogen fällt nur in Spuren aus), so läßt sich die Grünfärbung im Rückstand nachweisen. Eine leichte Grünfärbung läßt sich auch im melaninfreien Harn im hellen Bariumfiltrat nachweisen, so daß die Reaktion nicht spezifisch auf Melanin ist. Ähnlich ist es mit dem Melanogen und der blauen Färbung des Thormählen. Durch Barium läßt sich das Melanin entfernen. Im Filtrat läßt sich durch

Tabelle IV.

Thormählensche Reaktion.

Urin	Farbe	Melanogen	Thormählen
Melanin (Röntgen)	dunkel	—	grün
+ Barium Filtrat	gelb	—	schwach grün
Rückstand	dunkel	—	grün
Melanin + Melanogen	dunkel	+	stahlblau
+ $FeCl_3$	schwarz	—	rotbraun; blauer Niederschlag
+ Barium Filtrat	gelb	—	blau
Rückstand	schwarz	—	grün
+ Blei Filtrat	hellgelb	+	blauer Niederschlag
Rückstand	schwarz	—	grün
$HgSO_4$ Filtrat	hell	Spur	blau
Rückstand	schwarz	+	blau
$FeCl_3$ + $Ba(OH)_2$ Filtrat	gelb	—	blau
Rückstand	schwarz	—	—
$FeCl_3$ + Blei Filtrat	schwarz	—	rotbraun; blauer Niederschlag
Rückstand	schwarz	—	—

neutrales essigsaures Blei und schwefelsaures Quecksilberoxyd das Melanogen bis auf Spuren entfernen, doch gibt das Filtrat noch einen stark blauen Thormählen. Auch aus der Tabelle III ergibt sich Ähnliches. Der grüne Thormählen ist gewöhnlich mit dem Melanin, der blaue mit dem Melanogen vergesellschaftet.

Bei der Anstellung der Thormählenschen Reaktion mit Urin, der Melanin und Melanogen enthielt, setzt sich nach längerem Stehen der blaue Farbstoff ab, und eine grüne Lösung erscheint. Die grüne Farbgebung wird wohl vom blauen Thormählen überlagert.

Melanogen wird als das Chromogen des Melanins angesehen. Beim Abnehmen des Melanogens müßte letzteres entsprechend zunehmen. Dies ist nicht der Fall. Die Färbekraft des übergeführten Melanogens übertrifft die des Melanins um das Vielfache. Das Melanin läßt sich durch Barium und Blei leicht ausfällen, das oxydierte Melanogen aber nicht. Der Ursprungsort des Melanogens ist wahrscheinlich die Leber. Nur wenn melanotische Geschwülste dort sich vorfinden, wird Melanogen ausgeschieden. Aber auch hier nicht in allen Fällen. Unser Fall scheidet während der Röntgenbestrahlung kein Melanogen aus. Ähnliche Verhältnisse liegen wohl in den beiden Fällen von Feigl vor.

Die Adamkiewiczsche und Hopkins Reaktion war in unserem Fall im Urin und enteiweißten Blut negativ, schwach positiv fiel wie bei Feigl die Eiseltsche und Thormählensche Reaktion im Blut aus. Ein Fermentversuch wurde mit dem Blutserum angestellt, vom Urin wurde Abstand genommen, da das Melanin und Melanogen des zugefügten Urins die Ergebnisse unsicher machen. 5 ccm 0,1 % Tryptophan, 5 ccm 0,05 % Tyrosin, 5 ccm 0,1 % Adrenalin, 5 ccm emulgiertes Brombenzol, 5 ccm 0,1 % Glykokoll wurden mit 5 ccm Serum + 3 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd versetzt bei 24°. Nach 3 Stunden wurde ein Tropfen Eisenchlorid zugefügt. Tryptophan, Adrenalin, Brombenzol und Melanurikerserum zeigen Braunfärbung, während das normale Serum nur eine gelbliche Verfärbung zeigte mit Ausnahme des Glykokolls, das braun wurde; l-Tyrosin zeigte keinen Unterschied. Urämikerblut zeigte ähnliche Verhältnisse wie Melanurikerblut.

Aus der Literatur, die Feigl und Querner ausführlich mitgeteilt haben, geht hervor, daß schon Bartolin bei Pigmentkrebs schwarzen Urin beobachtet hat; Laënnec führt dann den Namen Melanose ein; Eiselt wies nach, daß ein Chromogen vorhanden ist, das durch oxydierende Substanzen tiefschwarz wird. Er glaubt darin eine spezifische Reaktion für Tumormelanin gefunden zu haben; Thormählen hält die nach ihm benannte Reaktion für spezifisch, was aber angezweifelt wurde. Feigl und Querner halten die Thormählensche Reaktion auch in ihrer grünen Farbgebung für spezifisch.

Andere Autoren fanden bei fehlenden Tumoren positive Eiseltsche Reaktion oder bei vorhandenen Melanotumoren negative Eiseltsche Reaktion. Häufig sind aber die maßgebenden Reaktionen nie vollständig ausgeführt worden, so daß aus der Literatur verhältnismäßig wenig sich ergibt. Die Melanosarkome der Haut und der Nebennieren bei Metastasen in der Leber ergeben Melanin, daneben häufig auch Melanogen im Urin. Thormählensche Reaktion wurde dabei nie angestellt. Melanosarkome des Auges mit Metastasen in der Leber ergeben neben Melanin meist positive Eiseltsche und Thormählensche Reaktion; es kommt aber auch vor, daß Melanin allein ausgeschieden wird, wobei die Thormählensche Reaktion grün ausfällt. Positive Eiseltsche und blaue Thormählensche Reaktion lassen mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein Melanosarkom des Auges mit Metastasen in der Leber schließen. Melanin mit grüner Thormählenscher Reaktion geben Anhaltspunkte dafür.

Auf die Fälle mit positiver Eiseltscher Reaktion bei fehlenden Melanotumoren kann nur wenig eingegangen werden, da die chemische Untersuchung ungenügend ausgeführt ist. Der Fall von Gnezda mit Darmtuberkulose gab bei Oxydation einen schwarzen Niederschlag, was bei echtem Melanogen nicht vorkommt. Der Fall von Zöppritz bei Ileus mit Peritonitis infolge eines Carcinoms des Sigmoideums läßt sich auch nicht heranziehen, da dort keine Thormählensche Reaktion angestellt wurde.

Es ist in Zukunft angebracht, daß zur weiteren Klarlegung der Melanurie stets sämtliche Reaktionen angestellt werden und daß das Nachdunkeln des Urins oder das Dunkler-

werden durch Oxydation nicht ohne weiteres als Melanurie bezeichnet wird.

Methodisches.

Die Nahrung war die ganze Zeit über kohlenhydratreich, eiweiß- und fettarm. Trotz guter Wasseraufnahme war das spezifische Gewicht des Urins hoch.

Der Urin wurde auf 1000 ccm aufgefüllt; der Gesamtstickstoff wurde in 5 ccm bestimmt. Harnstoff wurde nach Benedikt bestimmt: 10 ccm Urin + 3 g Kaliumsulfat + $1^1/_2$ g Zinksulfat.

Ammoniak wurde nach Folin bestimmt und zwar in 25 ccm Urin. Zur Vermeidung des Schäumens wurde Amylalkohol verwendet.

Kreatinin wurde nach Folins colorimetrischen Versuchen bestimmt im Autenrieth-Königsbergerschen Apparat.

Amino- und Peptidstickstoff. Zur Bestimmung wurde das Verfahren von Sörensen unter Befolgung der Gammeltoftschen Verbesserungen benutzt. Bei der geringen Ammoniakmenge konnte das nach Folin bestimmte Ammoniak ohne weiteres von dem direkt bestimmten Amino N abgezogen werden. Beim Peptid N wurde nach Erhitzen mit Salzsäure das entstandene Ammoniak im Vakuum abgesaugt und dann die Bestimmung ausgeführt.

Unbestimmter Stickstoff ist berechnet worden.

Melanin wurde nach entsprechender Verdünnung mit dem braunen Teil des Hämoglobinkeils im Autenrieth verglichen. Die Farben sind genau die gleichen.

Melanogen. Hier wurde wie beim Melanin verfahren nach Umwandlung des Melanogens. 20 ccm Urin + 2 ccm leicht ungesäuertes Eisenchlorid auf 500 ccm verdünnt gab den richtigen Farbenton.

Thormählen: Die Reaktion wurde in der von Eppinger angegebenen Weise ausgeführt, wobei die grüne, blaue, stahlblaue Farbgebung gut zu sehen war.

Ergebnis.

1. Echtes Melanogen wird meist dann gebildet, wenn melanotische Geschwülste in der Leber sich vorfinden.

2. Melanogen ist nicht das Chromogen des vorgebildeten Uromelanins, sondern gibt nach Oxydation ein chemisch vom vorgebildeten Melanin unterscheidbares Melanin.

3. Melanogen, Melanin stehen zu den ausgeschiedenen Aminosäuren und Peptiden in einem gewissen Verhältnis, derart, daß bei abnehmendem Melanogen die Peptide ansteigen.

4. Mit Melanin wird die Thormählensche Reaktion grün, jedoch ist dies keine spezifische Reaktion, mit Melanogen ist

der Ausfall der Reaktion ein blauer bis stahlblauer, jedoch auch nicht spezifisch.

5. Röntgenbestrahlung bewirkt für längere Zeit ein Verschwinden des Melanogens.

6. Aminosäuren und Peptide sind wie bei Kachexien vermehrt, jedoch ist die Harnstoffbildung nicht gestört.

Literatur.

J. Feigl und E. Querner, Arch. f. klin. Med. **123**, Heft 1, 107.

E. Querner, Deutsche med. Wochenschr. **51**, 1534, 1915.

Wadsack, Charité-Annalen **30**, 127, 1906.

Senator, Charité-Annalen **108**, 317, 1890.

Schönberg und Camac, New York Med. Journ. 1907, Jan. Ref. Centralbl. f. inn. Med. **1907**, 211.

Stiller, Arch. f. klin. Med. **16**, 414, 1875.

Litten, Deutsche med. Wochenschr. **8**, 41, 1889.

Ganghofner und Přibram, Vierteljahrsschr. f. prakt. Heilk. **2**, 77, 1876.

Hansen und Nolke, Arch. f. klin. Med. **62**, 1899.

Finkler, Centralbl. f. klin. Med. **2**, 1880.

Mörner, Zeitschr. f. physikal. Chem. **11**, 1887.

Dressler, Zeitschr. f. prakt. Heilk. **4**, 9, 1865,

Eiselt, Zeitschr. f. prakt. Heilk. **2**, 87, 1861.

Eppinger, Biochem. Centralbl. **28**, 181, 1910.

Thormählen, Virchows Archiv **108**, 317, 1887.

Bartolus, Zerlegung des menschl. Leibes. 1677, zit. bei Eiselt.

Laënnec, Bull. d. l. faculté d. med. d Paris. 1806, zit. bei Eiselt.

Jaksch, Zeitschr. f. physikal. Chem. **11**, 1887.

Über die angebliche einseitige Ionendurchlässigkeit der Froschhaut.

Von

Martin Gildemeister und Schükri Jussuf.

(Aus der physikalischen Abteilung des physiologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 10. Juni 1919.)

Mit 2 Figuren im Text.

Im elften Bande dieser Zeitschrift hat Bayliss[1]) Versuche mitgeteilt, aus denen er den Schluß zog, daß die Froschhaut in Ringerlösung elektrische Ströme von außen nach innen viel besser leite als umgekehrt. Er folgerte daraus in Übereinstimmung mit einer Hypothese von Galeotti, daß die Haut für Natriumionen von außen nach innen permeabel sei, nicht aber in umgekehrter Richtung. Am Schlusse seiner Arbeit sprach er den Wunsch aus, daß seine Resultate nachgeprüft werden möchten. Das scheint bisher trotz der großen Bedeutung, die dem einwandfreien Nachweis einer je nach der Richtung verschiedenen Ionenwanderungsgeschwindigkeit zukäme, nicht geschehen zu sein, vielmehr sind die Baylissschen Angaben unbezweifelt in die Literatur übergegangen.

Der eine von uns ist seit längerer Zeit mit dem Studium der Leitungseigenschaften der Haut beschäftigt und hat dabei Beobachtungen gemacht, die im Widerspruch mit den besagten Befunden von Bayliss stehen. Wir haben dieselben deshalb nachgeprüft und haben dabei folgendes gefunden:

1. in tatsächlicher Beziehung: die Beobachtungen von Bayliss sind nicht reproduzierbar, wenn man naheliegende

---

[1]) W. M. Bayliss, diese Zeitschr. Bd. 11, 226, 1908.

Versuchsfehler vermeidet; Froschhaut unter möglichst natürlichen Bedingungen zeigt keine irreziproke Leitfähigkeit;

2. in theoretischer Beziehung: die Tatsache irreziproker Leitfähigkeit, welch letztere in geringem Grade durch gewisse Einwirkungen bei der Haut hervorgerufen werden kann, läßt an und für sich keine Schlüsse auf Ionengeschwindigkeiten zu.

Die ausführliche Mitteilung unserer Versuche erfolgt gleichzeitig im Rubnerschen Archiv für Physiologie. Hier können wir uns darauf beschränken, das Wesentliche hervorzuheben.

Versuchsplan. Nach dem Vorgange von Bayliss sollte die Haut in einfacher Schicht von symmetrischen Wechselströmen durchflossen werden. Es war zu untersuchen, ob dann, vermöge unsymmetrischer Leitfähigkeit, eine Gleichstromkomponente auftrete.

Methode. Die Versuchsanordnung wurde zunächst genau der Baylissschen nachgebildet. Die Haut (sowohl von Temporarien als von Esculenten) bildete die Scheidewand zwischen zwei mit Ringerlösung gefüllten Gefäßen. Der Wechselstrom, erzeugt durch Kommutierung eines Gleichstroms mittels eines rotierenden Umschalters, wurde den Gefäßen durch platinierte Platinelektroden zugeleitet. Durch eine Schaltvorrichtung konnte ein Drehspulengalvanometer mit passend abstufbarer Empfindlichkeit einmal zwischen Stromquelle und Kom-

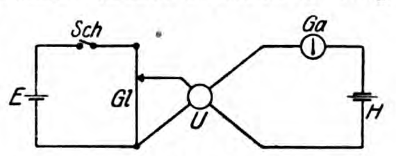


Fig. 1. Versuchsanordnung nach Bayliss: *E* Stromquelle, *Sch* Schlüssel, *Gl* Gleitdraht, *U* rotierender Umschalter, *Ga* Galvanometer, *H* Haut.

mutator, das andere Mal zwischen letzteren und die Haut eingeschaltet werden. Im ersten Falle wurde es von dem unkommutierten Strome durchflossen und maß die mittlere Stromstärke; im zweiten mußten sich die ablenkenden Wirkungen der alternierenden Stromstöße gegenseitig aufheben, sofern die Haut nicht die eine Richtung begünstigte. Leitet die Haut also in beiden Richtungen gleich gut, so bleibt das Galvanometer bei Schaltung II in Ruhe (Bayliss hat eine namhafte Ablenkung gesehen). Spätere Abänderungen der Methode

(Kochsalz- anstatt Ringerlösung, frequente Sinusströme, unpolarisierbare Elektroden) sind im weiteren Text erwähnt.

Versuche. Wir erhielten in zahlreichen Fällen, mit den Frequenzen 11 bis 50 in der Sekunde, bei Spannungen von 0,04 bis 2 Volt, ein vollständig negatives Ergebnis; die Haut verhielt sich genau wie ein Rheostat. Wir verfuhren immer so, daß wir zunächst nach Einschaltung eines Widerstandes an Stelle des Präparates den Kommutator auf Gleichheit der beiden Stromphasen einstellten und darauf in der Schaltung der Fig. 1 zusahen, ob bei Schließung des Schlüssels *Sch* das Galvanometer *Ga* einen Ausschlag machte. Als Nullpunkt galt die Stellung, die es nach Öffnung von *Sch* einnahm.

Wir vermuteten nun, daß wir mit zu niederen Frequenzen gearbeitet hätten und vertauschten Stromquelle und Umschalter mit einem akustischen Stromerzeuger, der Wechselströme von 230 bis 2100 Perioden lieferte, ohne daß sich das Resultat geändert hätte.

Nun ersetzten wir die Ringerlösung durch Kochsalz, da es offenbar unzweckmäßig ist, noch andere als die zu prüfenden Kationen in den Versuch einzuführen. Auch das änderte nichts am Ergebnis.

Die Aufklärung des Widerspruchs zwischen unseren Befunden und denen des zitierten Autors sollten einige zufällige Beobachtungen bringen. Als wir einmal mit 2 Volt arbeiteten, ließen wir den Meßdraht *Gl* fort (wobei sich also der Akkumulator *E* unmittelbar im Stromkreis befand) und sahen nun einen beträchtlichen Ausschlag, als wir den Schlüssel *Sch* schlossen. Er nahm, ganz wie es Bayliss beschrieben hatte, allmählich ab, wie wenn das anfangs vorhandene Gleichrichtungsvermögen der Haut verloren gehe. Das Vorzeichen der Gleichstromkomponente blieb wie bei Bayliss ungeändert, als die Pole der Stromquelle vertauscht wurden.

Die nähere Untersuchung dieses Phänomens lehrte, daß wir durch Ungleichartigkeit der Platinelektroden getäuscht waren. Sie laden sich, wenn man den Strom irrtümlich einmal bei stillstehendem Kommutator schließt, werden nun selbst zur Stromquelle und schicken durch das Galvanometer einen Gleichstrom, der mit zunehmender Depolarisation wieder mehr und mehr schwindet. Ist der Meßdraht *Gl* im Nebenschluß

zu *E* eingeschaltet, so spielt dieser Dauerstrom keine Rolle, da er ja schon in die Bestimmung des Nullpunktes mit eingeht.

Daß diese Auffassung richtig war, konnten wir durch Verwendung unpolarisierbarer Zink-Zinksulfatgelatine-Elektroden sicherstellen; dann zeigte sich niemals eine Gleichstromkomponente. Bayliss ist also anscheinend durch Polarisation seiner Elektroden irregeführt worden. Nur so ist es auch zu verstehen, daß er angibt, ein Gleichstrom durch die Froschhaut sinke sichtlich rapide und ein Stück ringerdurchfeuchteten Fließpapiers habe einen Widerstand von mehreren tausend Ohm.

Weitere Versuche über Gleichrichtung. Wir benutzten unsere Versuchsanordnung nun zur Untersuchung von Systemen, von denen es feststeht, daß sie irreziprok leiten. Es waren dies: 1. eine Polarisationszelle, bestehend aus Aluminium und einem andern Metall (hier Zink) in Natriumphosphatlösung; 2. ein Detektor („Perikon“, das sind zwei sich unter mäßigem Druck berührende Stücke von Bleiglanz und Rotzinkerz). Bei Nr. 1 wurde die eine Stromphase im Verhältnis zur anderen etwa zur Hälfte, bei Nr. 2 beinahe vollständig unterdrückt, d. h. der Galvanometerausschlag blieb fast der gleiche, wenn man von Schaltung I (S. 242) zu II überging. Damit war also bewiesen, daß die Methode für ihren Zweck durchaus geeignet ist.

Theoretisches.

Da es nun sehr viele Systeme gibt, die irreziproke Leitfähigkeit zeigen, ohne daß man in beiden Richtungen verschiedene Ionengeschwindigkeiten annehmen kann, so ist es klar, daß derartige spezialisierte Hypothesen noch anderweitig gestützt werden müßten, selbst wenn es gelänge, tierische Teile mit Gleichgewichtswirkung aufzufinden. Mit anderen Worten: ein Leiter, der ein Ion in einer Richtung schneller passieren ließe als in der anderen, wäre ein Gleichrichter, dieser Satz läßt sich aber nicht umkehren.

Von H. Brandes[1]) ist eine sehr einleuchtende Theorie der Gleichrichterwirkung entwickelt worden, die rein formal das Thema erschöpft. Sie läßt voraussehen, daß tierische Teile

[1]) H. Brandes, Elektrotechnische Zeitschr. **1906**, 1015.

unter gewissen Bedingungen diese Eigenschaft zeigen müssen. Es sei uns gestattet, kurz auf den Gedankengang dieser auch für die Physiologie sehr wichtigen Arbeit einzugehen und ihre Fruchtbarkeit an einem Beispiel zu zeigen.

Wir wollen annehmen, wir legten an einen Leiter verschiedene Spannungen e an und bestimmten jedesmal die Stromstärke i. Die zusammengehörigen Werte von e (Abszissen) und i (Ordinaten) werden in ein Koordinatensystem eingetragen, und die Kurve $i = f(e)$ werde die Stromspannungskurve oder Charakteristik genannt. Folgt der Leiter dem einfachen Ohmschen Gesetz $iw = e$ und ist w konstant, so ist die Ch. eine durch den Nullpunkt gehende Grade, andernfalls eine irgendwie gekrümmte Kurve.

Bei gekrümmter Charakteristik sind nun zwei Hauptfälle zu unterscheiden: a) Die Stromstärke ist unabhängig vom Vorzeichen der Spannung, d. h. die Ch. verläuft im ersten und dritten Quadranten symmetrisch (Fig. 2 A). Dann ist das System kein Gleichrichter für symmetrischen Wechselstrom. Denn die positive Phase erzeugt einen ebenso starken Strom wie die

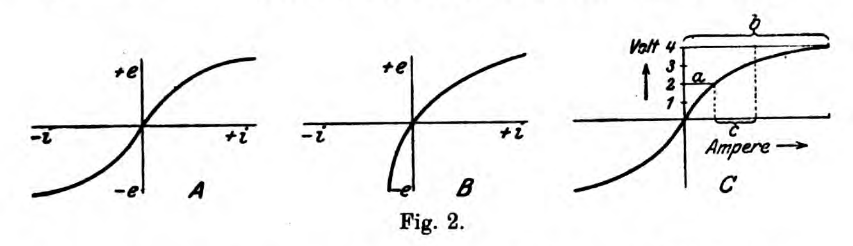


Fig. 2.

negative, jedoch in umgekehrter Richtung, das Gleichstromgalvanometer bleibt unbeeinflußt. b) Die Kurve verläuft im ersten Quadranten anders als im dritten (Fig. 2 B); dann erzeugt Wechselstrom eine Gleichstromkomponente, wie aus dem nächsten Abschnitt hervorgeht.

Durch einen Kunstgriff ist a) in b) überzuführen, nämlich durch Anlegung einer konstanten Hilfsspannung, d. h. Verschiebung des Koordinatensystems. Legen wir an einen solchen Leiter mit nicht gradliniger Ch. eine Gleichspannung, so wird er für gleichzeitig durchgeschickten Wechselstrom im allgemeinen als Gleichrichter wirken. Der strenge Beweis dafür ist nur auf mathematischem Wege zu führen (vgl. Brandes),

jedoch genügt in manchen Fällen auch die Anschauung. Die Froschhaut z. B. hat eine Charakteristik wie Fig. 2 C. Legen wir nun die Gleichspannung 2 Volt an, so wird ein Dauerstrom von der Stärke *a* (Fig. 2 C) entstehen. Ein Wechselstrom, bestehend aus alternierenden Stromstößen von 2 Volt Spannung, erzeugt[1]) mit dem Gleichstrom zusammen in einer Richtung den Strom *b*, in der anderen Null. Das Galvanometer wird sich auf den Mittelwert $b/_2$ einstellen, der wegen der Kurvenkrümmung größer als der schon vorher bestehende Dauerstrom *a* ist; zu letzterem ist also der Gleichstrom $b/_2 - a = c$ hinzugekommen. Der Wechselstrom ist also teilweise gleichgerichtet worden. Der Grund dafür liegt hier nicht in irreziproker Ionenleitfähigkeit, sondern formal in der Krümmung der Charakteristik[2]), und diese wiederum ist, wenigstens zum größten Teil, durch die Polarisation der Haut bedingt.

Die aus der Theorie vorauszusagende Gleichrichterwirkung der Haut mit angelegter Hilfsspannung haben wir im Versuch bestätigt gefunden. Es wurde zwischen *Ga* und *H* (Fig. 1) noch ein Akkumulator eingeschaltet, worauf das Galvanometer natürlich einen Dauerstrom anzeigte. Als nun bei laufendem Kommutator der Schlüssel *Sch* geschlossen wurde, stieg der Galvanometerausschlag beträchtlich, um 10$^0/_0$ oder mehr. Ähnlich war es bei einer Polarisationszelle mit Zink- oder Platinelektroden.

Aus der Form der Charakteristik ist auch abzuleiten, daß eine bestimmte Elektrizitätsmenge durch tierische Teile desto besser durchgelassen werden muß, je kürzer der elektrische Vorgang dauert. Das wirft Licht auf den sog. Fleischl-Effekt[3]). Welche Rolle für die Krümmung der Stromspannungskurve einerseits die Polarisation, andererseits die Stromwärme spielt, ist für diese rein formale Betrachtungsweise gleichgültig.

Schließlich ist noch zu bemerken, daß die Charakteristik für sehr kurz oder sehr lange dauernde Ströme oft eine andere

---

[1]) Es wird hier, um die Erörterungen nicht zu erschweren, vorausgesetzt, daß die Ch. auch bei schnellen Wechselströmen dieselbe Form habe. Tatsächlich mischen sich noch Depolarisationsströme usw. ein.

[2]) Der Nullpunkt des Koordinatensystems liegt jetzt am rechten Endpunkte von *a*. Von hier aus gerechnet ist die Ch. unsymmetrisch.

[3]) s. M. Cremer, Nagels Handb. d. Physiol., **4**, 919, 1909.

Form hat als für solche mittlerer Dauer. Bei künftigen Untersuchungen wäre in jedem Falle die den betreffenden Bedingungen entsprechende Kurve zu ermitteln und zugrunde zu legen.

Zusammenfassung. Die Froschhaut unter natürlichen Bedingungen ist, entgegen den Angaben von Bayliss, kein Gleichrichter für Wechselströme. Die von diesem Autor nach dem Vorgange von Galeotti behauptete einseitige Permeabilität für Natriumionen findet in elektrischen Durchströmungsversuchen keine Stütze.

Aus Gleichrichterwirkungen können ohne weiteres keine Schlüsse hinsichtlich Ionenwanderungsgeschwindigkeiten gezogen werden.

Aus einer von Brandes aufgestellten Theorie ist vorauszusagen, daß die durch Gleichstrom polarisierte Haut (und wahrscheinlich auch andere tierische Teile) Wechselströme teilweise gleichrichten muß. In bezug auf die Froschhaut wird diese Folgerung bestätigt. Der Grund dafür liegt formal in der Krümmung der Stromspannungskurve, welche wiederum durch die Polarisation (und die Stromwärme?) hervorgerufen wird.

Die Krümmung der letzterwähnten Kurve macht auch den Fleischl-Effekt formal verständlich.

Über das Verhalten geschützter Silberhydrosole in Elektrolytlösungen und Blutserum.

Vorläufige Mitteilung.

Von

I. Voigt-Göttingen.

(*Eingegangen am 24. Juni 1919.*)

Über das Verhalten von geschützten Silberhydrosolen — wie sie zu therapeutischen Zwecken in die Blutbahn injiziert werden — beim Zusammentreffen mit elektrolythaltigen Flüssigkeiten hatte ich bereits vor dem Kriege eine Reihe von Vorversuchen gemacht. Die Fortführung dieser Versuche wurde durch den Krieg zunächst vollständig verhindert; erst im Jahre 1916 konnte sie in beschränktem Maße wieder aufgenommen werden. Jetzt ist ein gewisser Abschluß erreicht, und es eröffnen sich mancherlei Perspektiven, aber das Anstellen weiterer systematischer Versuche begegnet zurzeit so großen Schwierigkeiten, daß eine vorläufige Mitteilung der Beobachtungen angezeigt erscheint. Vielleicht ist ein Verfolgen der Ideen an einem mit reicheren Mitteln arbeitenden Institut möglich.

Über die Einwirkung des Blutes auf das intravenös injizierte Silberhydrosol irgendwelchen Aufschluß zu bekommen, war der Grundgedanke der Versuche, über die im folgenden kurz berichtet werden soll. Da das Blut als ein Gemisch von Elektrolytlösungen und gewissen Hydrosolen anzusehen ist, sollte zunächst die Einwirkung der im Blute enthaltenen Elektrolyte studiert werden. Es wurden deshalb Versuche mit Ringerscher Lösung[1]) und zwei geschützten Silberhydrosolen

---

[1]) Natr. chlorat. 8,0; Natr. bicarb. 0,2; Calc. chlorat. 0,2; Kal. chlorat 0,2; Aq. dest. ad 1000,0.

angestellt, die mir auf Grund verschiedener Untersuchungen[1]) zu Injektionszwecken besonders geeignet erscheinen, dem Collargol und dem Dispargen. Eine Prüfung der beiden Trockenpräparate nach den Vorschriften der Pharm. Germ. V ergab im wesentlichen die in der folgenden Tabelle zusammengestellten Reaktionen:

Die Bestimmung der Teilchengröße hatte seiner Zeit für das Collargol 18,7 $\mu\mu$, für das Dispargen 14,2 $\mu\mu$ ergeben unter der Voraussetzung einer vollständigen Raumerfüllung der Teilchen mit Ag, die jedoch — nach dem jetzigen Stande unserer Kenntnisse — für geschützte Metallhydrosole wohl nicht zutreffen dürfte. Einen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Trockenpräparaten bildet der verschiedene Gehalt an Schutzkolloid, von dem das Collargol etwa 10%, das Dispargen jedoch etwa 70% enthält. Die Natur des Schutzkolloids ist mir von beiden nicht bekannt, aber eine Verschiedenheit ist schon a priori anzunehmen, denn es wäre doch zunächst nicht einzusehen, weshalb bei letzterem ca. 70% eines Stoffes im Trockenpräparat enthalten sein sollten, von dem beim ersteren etwa 10% zur Stabilisierung genügen.

Die Absicht, weiterhin auch mit dem Blutserum Versuche anzustellen, veranlaßte, daß ein aus den serologischen Untersuchungen bekanntes Verfahren angewendet wurde, indem man das dünne Silberhydrosol benutzte, um von der Ringerschen Lösung — wie von einem zu prüfenden Serum — steigende Verdünnungen herzustellen. Sechs schlanke Reagensröhrchen wurden mit dem Silberhydrosol beschickt und zwar enthielt das erste 1,8 ccm, die folgenden je 1 ccm. Von der Ringerschen Lösung wurden 0,2 ccm in das erste Röhrchen gebracht und nach Durchmischen die Hälfte seines Inhaltes (1 ccm) in das zweite übertragen usw. Durch Probieren war zuvor festgestellt worden, daß eine 0,0625%ige Auflösung von Collargol — von einer gewissen Verschiedenheit des Farbtones abgesehen — einer 0,04%igen Dispargenauflösung in der Helligkeit etwa entsprach. Denn es wurde Wert darauf gelegt, die verschiedenen Proben im durchfallenden wie im auffallenden Lichte miteinander ver-

[1]) Diese Zeitschr. 62, 3/4. Militärärztl. Zeitschr. 1917, 21/22. Therap. Monatsh. 28, 9.

Tabelle I.

Trockensubstanz	Collargol	Dispargen
	kleine schieferfarb. Splitter und Plättchen	glatte blauschwarze glänzende Lamellen
Aussehen der 2%igen Auflösg.	tiefdunkelbraun, etw. trübe mit grünl. Schimmer i. der Aufsicht, i. dünner Schicht in der Durchsicht klar, in dickerer inf. der dunklen Färbung undurchsichtig	dunkelblaurot, i. d. Aufsicht trübe mit blauviolettem Schein; in dünner Schicht i. d. Durchsicht klar, in dickerer inf. der dunklen Färbung undurchsichtig
Auf Zusatz verdünnter Mineralsäure	schon geringe Menge bewirkt ausgesprochene Graufärbung; schon nach kurzer Zeit grauer Bodensatz	zunächst keine Veränderung; nach einiger Zeit dunklere Färbung; in der Aufsicht trüber, n. einigen Stunden schmutziggrün, schließl. schokoladenbraun, setzt langsam etwas ab
bei nachfolgendem Neutralisieren	Bodensatz geht wieder in feine Zerteilung. Aussehen wie vorher	ebenso
Beim Glühen	Geruch nach verbrannten Haaren; Rückstand blendendweiß	ebenso
Beim Behandeln des Rückstandes mit HNO_3	löst sich kaum in der Kälte, beim Erwärmen milchig getrübte Lösung	löst sich in der Kälte
Beim nachfolgenden Behandeln mit HCl	weißer Niederschlag	milchige Trübung, wenig Niederschlag, den HCl im Überschuß löst, dabei geringe Gelbfärbung der Flüssigkeit
Weiterbehandeln mit NH_3	Niederschlag löst sich	Flüssigkeit klar, Niederschlag gelöst
Bei Zusatz von NaCl-Lösungen zur 2%igen Auflösung	sofort Umschlag d. Farbe nach graugrün, setzt langsam schwarzgrün ab	zunächst unverändert, allmählich in der Aufsicht trüber mit blaugrau-grünem Schimmer, kein Bodensatz
Bei Zusatz von NaCl im Überschuß	Farbumschlag und reichliches, schnelles Absetzen	ausgesprochene graugrüne Trübung, schnelles Absetzen
Bei nachfolgendem Verdünnen mit viel Wasser	geht wieder in feine Verteilung, behält aber eine leichte Trübung	geht nicht wieder in feine Zerteilung

gleichen zu können. Die Versuche verliefen nun so, daß von der Ringerlösung mit dem Ag-Hydrosol möglichst schnell

Verdünnungen auf $^1/_{10}$, $^1/_{20}$, $^1/_{40}$, $^1/_{80}$, $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ hergestellt und die Reagensgläser dann mit steriler Watte fest verschlossen wurden. In jedem einzelnen Fall wurde, um die eventuelle Einwirkung der Luft oder dergleichen schwer bestimmbarer Faktoren erkennen zu können, eine Kontrollreihe angesetzt, in der die Ringerlösuug durch frisch destilliertes Wasser ersetzt wurde. Die beobachteten Erscheinungen sind im folgenden nach Möglichkeit präzise charakterisiert, Tabellen aufzustellen wurde aufgegeben, da es sich als unmöglich erwies, die Verschiedenheiten in den Farbtönen genau zu benennen.

Mit Collargollösung von 0,0625 % wurden 3 Versuchsreihen angestellt und ebensoviel Kontrollen. Etwa $^1/_2$ Stunde nach dem Zusammenbringen mit der Ringerschen Lösung in der oben beschriebenen Weise fand sich eine Abstufung der Färbung von einem hellen Braungelb bei der stärksten Konzentration der Ringer-Lösung ($^1/_{10}$) bis zum dunklen Rotbraun bei der niedrigsten ($^1/_{320}$). Alle Proben waren im durchfallendem Lichte klar und zeigten im auffallenden einen leicht grünlichen Schimmer. In den nächsten Stunden traten erhebliche Veränderungen nicht mehr auf, jedoch nahmen die Proben von $^1/_{40}$ abwärts einen mehr ins Rote gehenden Farbton an. Nach 24 Stunden war eine weitere Veränderung in der Weise vor sich gegangen, daß $^1/_{10}$ bis $^1/_{80}$ in abnehmendem Maße im durchfallenden Lichte getrübt erschienen; im auffallenden war eine Trübung noch deutlicher wahrzunehmen, denn $^1/_{10}$ erschien fast milchig getrübt, und selbst bei $^1/_{160}$ fand sich noch eine stärkere Opaleszenz, als bei der Ausgangslösung. Beim Vergleich mit den Kontrollen zeigte sich, daß die Skala der Farbentöne zunächst die gleiche war, sich dann aber in der Weise änderte, daß bei den Versuchen mit elektrolythaltiger Flüssigkeit die Farbe bei allen Proben deutlich heller wurde, wie bei den Kontrollproben und ferner der Farbton von $^1/_{40}$ abwärts mehr ins Rötliche ging. Bei den Versuchen mit Ringer-Lösung fand sich nach 24 Stunden eine — mit abnehmender Konzentration geringer werdende Trübung bis $^1/_{80}$ resp. $^1/_{160}$, die bei den Kontrollen fehlte, also nur durch die Salze der Ringer-Lösung bedingt worden sein konnte.

Hiervon ganz verschieden verhielt sich das Dispargen, das in der Konzentration von 0,04 % ebenfalls dazu verwendet

wurde, steigende Verdünnungen von Ringer-Lösung herzustellen. Schon kurz nach dem Ansetzen der Proben in 3 Versuchsreihen begann eine auffallende Farbenveränderung derselben. Die 0,04 %ige Dispargenlösung hat eine ausgesprochen dunkelkarminrote Farbe und im auffallenden Lichte einen dunkelblauvioletten Schimmer; diese blieben aber nur bei den stärksten Verdünnungen der Ringer-Lösung — zunächst wenigstens — unverändert. Mit steigender Konzentration wurden die Proben nicht nur sehr viel heller, weit stärker, als es dem vermehrten Gehalt an Wasser entsprach, sondern ihre Farbe änderte sich immer mehr nach dem Gelb hin, so daß man bereits nach $^1/_4$ Stunde eine Farbenskala erhielt, die vom dunklen Karminrot ($^1/_{320}$) über Zinnober, Orange und Strohgelb bis zum ausgesprochenen Hellgelb ($^1/_{10}$) ging. In der Durchsicht erschienen die höheren Konzentrationen, $^1/_{10}$ bis $^1/_{40}$ vollkommen klar, $^1/_{80}$ leicht, $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ sogar ausgesprochen trübe. Im auffallenden Lichte fand sich eine im gleichen Maße zunehmende Opaleszenz, die bei $^1/_{10}$ bis $^1/_{80}$ hellgrünlich, bei $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ jedoch blau erschien. Bereits nach Ablauf der ersten Stunde hatte die Trübung erhebliche Fortschritte gemacht, indem bei $^1/_{320}$ schon ein Absetzen erkennbar wurde und sich jetzt auch bei $^1/_{40}$ eine leichte Trübung, ein Beweis für eine Teilchenvergröberung im durchfallenden Lichte zeigte. Im Laufe der nächsten Stunden ging dieser Prozeß weiter, und nach 12 Stunden erschien bei $^1/_{320}$ die Flüssigkeit wasserklar, das gesamte Ag war ausgefallen; auch bei $^1/_{160}$ erschien die Flüssigkeit fast völlig wäßrig, bekam nur durch vereinzelte suspendierte Teilchen noch ein fleischwasserfarbenes Aussehen. Nach 24 Stunden hatte auch $^1/_{160}$ vollkommen und $^1/_{80}$ teilweise abgesetzt, während die übrigen Proben mit zunehmender Konzentration immer weniger getrübt erschienen und sich nicht weiter verändert hatten. — Auch das Verhalten des Dispargens bei den Kontrollproben mit Wasser unterschied sich erheblich von dem des Collargols, denn nach dem Mischen der 0,04 %igen Auflösung mit destilliertem Wasser trat überall, bei den ersten ($^1/_{10}$ und $^1/_{20}$) fast augenblicklich, bei den weiteren innerhalb der ersten $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde eine Trübung auf, die überall zum Absetzen führte und zwar um so schneller, je mehr Wasser die Probe enhielt. Auch die jedesmal frisch hergestellte 0,04 %ige Auflösung des

Trockenpräparates erwies sich nicht als haltbar und veränderte sich, wenn auch langsamer, in derselben Weise.

Die verschiedenen eben geschilderten Erscheinungen sind nicht so einfach zu erklären, auch ist die Versuchsanordnung dafür nicht geeignet. Hier Klarheit zu schaffen muß besonderen Versuchsreihen vorbehalten bleiben[1]), doch kann man schon jetzt mit Bestimmtheit annehmen, daß das abweichende Verhalten der beiden Präparate in der Verschiedenheit des Schutzkolloides begründet ist.

Ehe wir uns nun zu den Versuchen mit Serum wenden, mögen die wesentlichen Ergebnisse der bisherigen Beobachtungen kurz zusammengefaßt werden:

Dünne Lösungen von Collargol und Dispargen mit elektrolythaltigen Flüssigkeiten (Ringer-Lösung) in absteigender Konzentration in der oben geschilderten Weise zusammengebracht, lassen beide eine Änderung in der Farbe erkennen, die nicht allein durch die Verschiedenheit des Wassergehaltes der einzelnen Proben bedingt sein kann; die mit destilliertem Wasser an Stelle der Ringer-Lösung angesetzten Kontrollproben zeigten diese nicht. Beim Collargol war neben dem Hellerwerden gegenüber den Kontrollproben nur das Auftreten eines mehr roten Farbtones bei den stärkeren Verdünnungen der Ringer-Lösung zu bemerken gewesen. Die Klarheit der Proben im durchfallenden und ihr Ansehen im auffallenden Licht hatte sich nicht merklich geändert. — Das Dispargen zeigte hingegen schon kurz nach den Zusammenbringen mit der Ringer-Lösung eine mit steigender Konzentration derselben zunehmende Aufhellung. Dabei änderte sich auch die Farbe der Proben in auffallender Weise, indem die ursprünglich dunkelkarminrote Ausgangsflüssigkeit, das 0,04 prozentige Silberhydrosol, mit steigender Konzentration der Ringer-Lösung über Zinnober, Orange und Strohgelb bei $^1/_{10}$ ein ausgesprochenes Hellgelb zeigte. Von der Verdünnung auf $^1/_{80}$ abwärts bis $^1/_{320}$ war ein immer stärkeres Absetzen zu beobachten. Beim Zusammenbringen der Dispargenlösung mit destilliertem Wasser blieb diese Farbänderung vollständig aus, es zeigte sich nur überall

[1]) Derartige Versuche werden zurzeit am Inst. f. anorg. Chemie in Göttingen ausgeführt

eine deutliche Trübung, die mehr oder weniger schnell zu einem deutlichen Absetzen führte.

Nachdem wir über die Wirkung der im Blute befindlichen Elektrolyte auf gewisse dünne Silberhydrosole Aufschluß erhalten hatten, wurde die gleiche Versuchsanordnung benutzt, um auch den Einfluß des Blutserums auf dieselben zu studieren. Etwa sich ergebende Verschiedenheiten müßten dann auf die im Serum enthaltenen Kolloide bezogen werden. Um zu studieren, ob das Blutserum bei gewissen Erkrankungen sich dergestalt veränderte, daß seine Einwirkung auf die geschützten Silberhydrosole von der des normalen Serums abwiche, wurden auch Versuche mit dem Serum von Kranken angestellt. NB. Es würden für weitere Versuche besonders Sera von Typhus- und Syphiliskranken zu empfehlen sein, weil sowohl die Widalsche wie die Wassermannsche Reaktion offenbar kolloidchemischer Natur ist.

Von dem Serum eines Gesunden wurden sowohl mit 0,0625 % Collargol wie auch mit 0,04 % Dispargen Verdünnungen von $^1/_{10}$ bis $^1/_{320}$ hergestellt und gleichzeitig Kontrollproben angesetzt, in denen destilliertes Wasser die Stelle des Blutserums einnahm. Bei Collargol waren nach $^1/_2$ Stunde die von den Versuchen mit Ringer-Lösung her bekannten Farbenunterschiede erkennbar; alle Proben waren merklich heller als die Kontrollproben, und die stärkste Verdünnung des Serums war am dunkelsten und hatte einen Stich ins Rote. Im Laufe der nächsten Stunden änderte sich das Bild in merkwürdiger Weise. Aus der Reihe der vom Braungelb ($^1/_{10}$) bis zum Braunrot ($^1/_{320}$) abgetönten Proben, die zunächst alle gleich klar waren, bildete sich zuerst bei der Verdünnung $^1/_{80}$ ein deutlicher Niederschlag, und die darüberstehende Flüssigkeit erschien ganz hellgelb. Bei $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ hatte sich inzwischen nur ganz wenig abgesetzt und der Farbton der Flüssigkeit war nicht merklich verändert. Die übrigen Proben setzten etwas mehr ab, ohne daß sich die Farbe der Flüssigkeit verändert hätte. Über Nacht hatte $^1/_{40}$ stärker abgesetzt und etwa denselben hellgelben Farbton angenommen, wie $^1/_{80}$, während $^1/_{10}$ und $^1/_{20}$ jetzt dunkler erschienen, als die beiden folgenden Proben. Der Bodensatz bei $^1/_{40}$ war etwa hellbraun, ziemlich locker und voluminös, $^1/_{80}$ dunkelbraun und dicht. $^1/_{160}$

und $^1/_{320}$ waren beide etwa zinnoberrot, ersteres etwas heller, beide in der Durchsicht trübe mit etwas grünlichem Ton, im auffallenden Licht ausgesprochen trübe, braungrünlich. Nach 24 Stunden bot sich folgendes Bild: $^1/_{10}$ orange, klar, mit etwas Bodensatz, $^1/_{20}$ strohgelb, klar, mit etwas mehr Bodensatz, $^1/_{40}$ und $^1/_{80}$ fast wasserhell, hatten vollständig abgesetzt. $^1/_{160}$ war orangerot, mäßig getrübt mit etwas Bodensatz und $^1/_{320}$ dunkel zinnoberfarben, wenig trübe, mit wenig Bodensatz.

Mit Dispargen gab dasselbe Serum folgende Reaktionen: nach $^1/_2$ Stunde war der Farbton bei allen Proben nur wenig verändert, die stärkste Verdünnung des Serums erschien am hellsten, in der Aufsicht jedoch am meisten getrübt. Nach etwa $1\,^1/_2$ Stunden hatten die Verdünnungen auf $^1/_{10}$ bis $^1/_{40}$ ziemlich die gleiche braunrote Farbe angenommen, $^1/_{10}$ und $^1/_{20}$ waren klar, $^1/_{40}$ zeigte im auffallenden Lichte einen grünlichen Schimmer. Bei den weiteren Verdünnungen war die Trübung deutlicher und zwar setzte auch hier $^1/_{80}$ zuerst ab, und die Flüssigkeit wird hier schon nach $1^1/_2$ Stunden merklich heller Bei $^1/_{160}$ waren die Veränderungen nicht so deutlich; $^1/_{320}$ hatte kaum abgesetzt und erschien am dunkelsten.

Von einem Magendarmkranken war Serum zwecks Untersuchung auf Typhus entnommen worden, und ein Rest davon wurde für diese Untersuchungen mitverwendet. Mit der 0,04 $^0/_0$igen Dispargenlösung wurde das Serum verdünnt und zwar im Verhältnis von 1 : 10 bis 1 : 320.

Nach $^1/_2$ Stunde fand sich bei $^1/_{10}$ bis $^1/_{80}$ eine Farbe, vom hellen zum dunkelen Rubinrot ansteigend, $^1/_{160}$ war stark getrübt und heller gefärbt, $^1/_{320}$ etwas dunkler, aber auch deutlich getrübt.

Nach 1 Stunde erschienen die Verdünnungen von $^1/_{10}$ bis $^1/_{80}$ unverändert, $^1/_{160}$ hatte stark abgesetzt und war noch heller geworden. $^1/_{320}$ hatte weniger abgesetzt und war dunkler, beide erschienen weniger trübe als vorher.

Nach 3 Stunden war $^1/_{10}$ etwa portweinfarben, $^1/_{20}$ bis $^1/_{80}$ mehr rubinrot, $^1/_{80}$ am dunkelsten. $^1/_{160}$ — etwa fleischwasserfarben — hatte reichlich abgesetzt. $^1/_{320}$ erschien etwas mehr rötlich, sonst aber wie $^1/_{160}$. Nach 5 Stunden hatten $^1/_{10}$ bis $^1/_{80}$ fast übereinstimmend etwa hellkarminrote Farbe und

waren klar ohne jeden Bodensatz. $^1/_{160}$ und $^1/_{130}$ waren wie vorher. Weitere Veränderungen wurden nicht beobachtet.

Eine Reihe weiterer Versuche wurden mit dem Serum eines Mannes gemacht, welcher eine Ty.-Bazillen-Aufschwemmung zu Immunisierungszwecken — und zwar intravenös — injiziert erhielt. Diesem wurde I. vor der Injektion sowie II. 2 Minuten und III. 24 Stunden nach derselben Blut entnommen. Von dem daraus gewonnenen Serum wurden die üblichen Verdünnungen — immer mit 1 ccm der 0,0625 $^0/_0$igen Collargollösung, resp. der 0,04 $^0/_0$igen Dispargenlösung hergestellt, so daß 3 $\times$ je 2 Parallelreihen (A und B) beobachtet wurden. Außerdem wurde jedesmal noch eine Kontrollreihe mit destilliertem Wasser angesetzt.

A. I. Collargol 0,0625 $^0/_0$ 10 Tropfen mit 1 ccm Serum I.

Nach $^1/_2$ Stunde fand sich die Abstufung von Braungelb ($^1/_{10}$) bis fast Karmin mit leicht bräunlichem Ton ($^1/_{320}$); die letztere war leicht getrübt, alle anderen waren klar. Die weiteren Veränderungen gingen ganz allmählich vor sich, deutliche Unterschiede waren nach den ersten 6 Stunden jedenfalls nicht zu beobachten.

Nach der Nacht, etwa 16 Stunden nach Ansetzen der Proben, fand man, daß dieselben alle deutlich dunkler geworden waren. Bei $^1/_{80}$ trat wieder ausgesprochene Trübung zutage, auch bemerkte man deutlichen Bodensatz. $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ waren leicht getrübt, die anderen ganz klar.

B. I. Dispargen 0,04 $^0/_0$ 10 Tropfen mit 1 ccm Serum I.

Nach $^1/_2$ Stunde war die Farbe der Flüssigkeit in allen Proben nur wenig verändert, jedenfalls bei den ersten Verdünnungen nicht so ausgesprochen gelb. Von $^1/_{80}$ ab fand man eine zunehmende Trübung. In den nächsten Stunden setzten die stärkeren Verdünnungen allmählich ab und wurden dadurch etwas heller. Am folgenden Morgen war $^1/_{10}$ bis $^1/_{40}$ dunkler, mehr rotgefärbt, $^1/_{80}$ war dunkelfleischwasserfarben und zeigte einen etwa hirsekorngroßen Bodensatz. $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ waren wasserklar, und der Niederschlag bedeckte, in dünnster Schicht etwa $^2/_3$ der Kuppe des Reagenzglases.

A II. Nach $^1/_2$ Stunde war $^1/_{10}$ gelbbräunlich, leicht getrübt, $^1/_{20}$ und $^1/_{40}$ waren schmutzig fleischwasserfarben und stark getrübt. $^1/_{80}$ war braungelb, mäßig getrübt. $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ waren dunkelbraungelb, klar und leicht grünlich opalisierend. In den nächsten Stunden nahm die Trübung in $^1/_{10}$ bis $^1/_{80}$ zu, $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ wurden leicht getrübt. Am anderen Morgen (nach ca. 16 Stunden): $^1/_{10}$ dunkelzinnoberfarben, trübe, hatte etwas abgesetzt (stecknadelkopfgroß.) $^1/_{20}$ und $^1/_{40}$ waren wasserhell, feiner Niederschlag bedeckte in dünner Schicht die Kuppe. $^1/_{80}$ hatte etwa die Farbe von $^1/_{10}$, jedoch mehr Bodensatz. $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ waren etwas klarer und dunkler.

B II. Nach $^1/_2$ Stunde fand sich etwa dieselbe Farbenskala wie

bei den Proben mit Ringer-Lösung, überall war die Flüssigkeit — mit zunehmender Verdünnung steigend — leicht getrübt. In den nächsten Stunden wurde bei $^1/_{80}$ bis $^1/_{320}$ eine Ausflockung erkennbar. Nach 16 Stunden war $^1/_{10}$ mehr nach Rot getönt, deutlich heller als die Ausgangslösung, leicht getrübt. $^1/_{20}$, hellrot, hatte etwas abgesetzt, $^1/_{40}$ blaßrotgelb war klar, der ziegelfarbene Niederschlag bedeckte die Kuppe. $^1/_{80}$ bis $^1/_{320}$ waren noch heller, fast wasserklar und hatten ebenfalls etwa zinnoberroten Bodensatz.

A III. Nach $^1/_2$ Stunde war der Farbton bei allen Proben im wesentlichen gleich gelbbraun, mit steigender Verdünnung des Serums immer weniger trübe, $^1/_{10}$ ausgesprochen trübe, $^1/_{320}$ ganz klar; alle Proben opalisierten leicht grün. In den folgenden Stunden wurde die Trübung bei den Verdünnungen von $^1/_{10}$ bis $^1/_{40}$ stärker. Nach 16 Stunden war mit zunehmender Verdünnung des Serums die Farbe der Flüssigkeit immer dunkler, $^1/_{10}$ bis $^1/_{40}$ hatten mäßig abgesetzt.

B III. Nach $^1/_2$ Stunde $^1/_{10}$ bis $^1/_{40}$ ziemlich gleich gefärbt, aber mit steigender Verdünnung immer stärker getrübt. In den nächsten Stunden nahm die Trübung zu, $^1/_{80}$ bis $^1/_{320}$ wurden ziemlich gleichmäßig fleischwasserfarben und begannen abzusetzen. Nach 16 Stunden war die Farbe von $^1/_{10}$ bis $^1/_{40}$ immer heller geworden, $^1/_{40}$ hatte etwas abgesetzt. $^1/_{80}$ bis $^1/_{320}$ waren wasserhell und hatten vollständig abgesetzt.

Von einem typhusagglutinierenden Serum wurden in der üblichen Weise Verdünnungen von $^1/_{10}$, $^1/_{50}$, $^1/_{100}$ und $^1/_{200}$ hergestellt und zu jeder Probe 10 Tropfen der 0,04$^0/_0$igen Dispargenauflösung hinzugefügt. Das ursprünglich gleiche Aussehen der Proben änderte sich innerhalb von etwa 10 Minuten und man erhielt der Verdünnung entsprechend eine Abstufung dunkelgelb zu hellgelb. Weitere Veränderungen wurden in den nächsten Stunden nicht beobachtet. Bei einem Parallelversuch wurden je 20 Tropfen der Dispargenlösung zugesetzt. Es ergab sich im wesentlichen das gleiche Bild, bei den beiden ersten Verdünnungen zeigte sich jedoch außerdem noch eine leichte Trübung mit grünlichem Schimmer in der Aufsicht.

Von demselben Serum wurden mit 0,04$^0/_0$ Dispargenlösung Verdünnungen zu $^1/_{10}$, $^1/_{20}$, $^1/_{40}$, $^1/_{80}$, $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ hergestellt. Nach einigen Minuten erschien nur die stärkste Verdünnung noch klar, die übrigen Proben waren mit steigender Konzentration trüber und in auffallendem Lichte heller aussehend. Eine Änderung des Farbentones trat erst allmählich ein, zunächst unter zunehmender Trübung. Nach 16 Stunden hatte bei vielen Proben ein Absetzen stattgefunden, und es fand sich folgende Reihe: $^1/_{10}$ blaßgelb, leicht opalisierend,

reichlich schmutzigbrauner Bodensatz, $^1/_{20}$ ausgesprochen gelb, trüber, mäßig reichlich rotgelber Bodensatz, $^1/_{40}$ rotgelb, stark opalisierend, aber kaum trübe, hat nur wenig rötlich abgesetzt. $^1/_{80}$ orange, fast klar, nur wenig opalisierend, hat kaum abgesetzt. $^1/_{160}$ gelblich, klar mit mäßig reichlichem blutroten Bodensatz. $^1/_{320}$ wasserhell, hat vollständig blutrot abgesetzt.

Das Serum (Typhusserum) wurde mit 0,04%iger Dispargenlösung verdünnt von $^1/_{10}$ bis $^1/_{320}$. Erst nach 6 Stunden waren Veränderungen im Aussehen der Proben zu erkennen: die stärksten Verdünnungen erschienen im durchfallenden Lichte etwas heller, als die übrigen Proben und zeigten in der Aufsicht statt des violetten einen grünlichen Schimmer. Innerhalb der nächsten 24 Stunden setzten die Verdünnungen $^1/_{160}$ und $^1/_{320}$ etwas ab, so daß danach die Proben noch etwas heller waren. Anderweitige Veränderungen wurden nicht beobachtet.

Die Ergebnisse der mit dem Serum von Gesunden und Kranken aufgestellten Versuche lassen sich etwa in folgende Sätze zusammenfassen:

I. Die zu den Versuchen benutzten dünnen Silberhydrosole geben mit Serum bei der angewandten Versuchsanordnung Reaktionen, die nicht vollständig mit denen übereinstimmen, die sie mit Ringerscher Lösung zeigten. Diese Verschiedenheit ist auf die Kolloide des Blutserums zurückzuführen. II. Die mit verschiedenen Seren erhaltenen Reaktionen unterscheiden sich untereinander. Diese Tatsache scheint darauf hinzuweisen, daß bei verschiedenen Erkrankungen — nicht nur bei den durch bestimmte Serumreaktion bekannten — die Kolloide des Blutserums in gewisser Weise verändert werden. Es wäre dann nicht aussichtslos — ev. unter Verwendung von kolloidem Silber oder Gold als Indikator — bestimmte organische Kolloide zu suchen, die bei einer bestimmten Erkrankung eine bestimmte und möglichst deutliche Reaktion gäben. III. Besonders beachtenswert erscheint die Tatsache, daß bei der einen Versuchsperson nach intravenöser Injektion einer Aufschwemmung von abgetöteten Typhusbazillen das Blutserum mit den Silberhydrosolen Reaktionen ergab, die sich von den vorher mit demselben erhaltenen erheblich unterschieden.

Bei dem Bestreben, im Kampf gegen die Infektionskrankheiten sich möglichst aller zur Verfügung stehenden Mittel zu

bedienen, ja ihre Wirkung durch Kombination zu steigern, liegt der Gedanke nahe, etwa ein spezifisches Serum mit einem Metallhydrosol, z. B. mit kolloidem Silber zu mischen. Ich habe im Jahre 1916 einige Versuche in dieser Richtung gemacht, dieselben aber zunächst wieder aufgegeben, da die Vorbedingungen für ein systematisches Arbeiten in dieser Richtung — nämlich die Kenntnis der Reaktionen von Serum und Silberhydrosol — fehlten. Die oben mitgeteilten Untersuchungen sollten hierüber zunächst einige Klarheit schaffen, sie zeigen aber auch, wie unendlich kompliziert die in Frage kommenden Verhältnisse sind.

Eine Erklärung für die eigenartigen Erscheinungen zu geben, soll hier garnicht versucht werden. Neue Untersuchungen, die eine mehr chemische Methode verwenden, sind im Gange und werden — wie es bis jetzt den Anschein hat — manche Erklärung ermöglichen. Einen ganz klaren Überblick werden wir aber wohl niemals gewinnen, denn die zelligen Elemente des Blutes, die Fibrinbildner, seine Gase und die Wirkung der lebenden Gefäßwand, sie alle müssen wir im Laboratoriumsversuch vernachlässigen.

Chemische Studien zur Physiologie und Pathologie.

VIII.

Zur Frage der Jodbindung in der Schilddrüse.

Von

E. Herzfeld und R. Klinger.

(Aus dem chemischen Laboratorium der medizinischen Klinik und aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 26. Mai 1919.)

In einer früheren, an anderer Stelle erschienenen Mitteilung [1]) haben wir versucht, einige Tatsachen der Schilddrüsen-Physiologie und Pathologie chemisch aufzuklären; hierbei wurde u. a. auch die Form der Jodbindung in der Schilddrüse und die Bedeutung dieses Stoffes für die Funktion des Organes erörtert. Wir haben damals die Ansicht ausgesprochen, daß die Bindung des Jodes in dieser Drüse auf Salzverbindungen beruhe, durch welche Jodalkalien an den Eiweißabbauprodukten des Zelleiweißes festgehalten werden. Wir sind inzwischen dieser Frage noch weiter nachgegangen, wozu wir teils durch unsere eigenen Arbeiten, namentlich aber durch einen Briefwechsel mit Prof. F. Blum angeregt wurden; derselbe machte uns auf eine Reihe von Publikationen aufmerksam, in denen er gemeinsam mit R. Grützner und anderen Mitarbeitern zu dieser Frage Stellung genommen hatte [2]). Die Ergebnisse der hierdurch veranlaßten Versuche seien im folgenden kurz mitgeteilt.

Wir möchten zunächst hervorheben, daß die ältere, auch in den erwähnten Arbeiten Blums vertretene Ansicht, daß es

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. **1918**, Nr. 24.

[2]) Studien zur Physiologie der Schilddrüse. Zeitschr. f. physiol. Chem. **85**, **91** und **92**.

direkte Jod-Eiweißverbindungen gebe, auf Grund unserer jetzigen Kenntnisse vom Bau der Eiweißkörper nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Es darf vielmehr als sicher gelten, daß Eiweiß als solches nicht jodiert werden kann, sondern daß stets nur die Abbauprodukte der kolloiden oder anderen Eiweißoberflächen es sind, die mit Jod Verbindungen eingehen. Treffen wir somit auf jodhaltige Eiweißkörper, so ist zu untersuchen, ob das Jod im Innern der Eiweißpartikelchen oder nur an den oberflächlichen Abbauprodukten verankert ist. Ist ersteres der Fall („jodiertes" Eiweiß im engeren Sinn), so kann dies nur so entstanden sein, daß zunächst Eiweißbausteine mit Jod in Verbindung traten und dann in dieser Form zu Eiweiß synthetisiert wurden. Beim künstlichen Jodieren von Eiweißlösungen kann es sich nur darum handeln, daß Jod an die Abbauprodukte der kolloiden Eiweißoberflächen gebunden wird[1]).

Für derartige Verbindungen bestehen nun zwei Möglichkeiten: die bloße Neutralsalzverbindung (Anlagerung von JNa oder JK an NH_2-Gruppen der Aminosäuren) oder Bildung von Jodsubstitionsprodukten (z. B. Jodtyrosin).

Wir haben es in der erwähnten Arbeit als wahrscheinlich bezeichnet, daß die erstere Bindungsart vorliegt, weil es uns nicht möglich erschien, daß im Organismus Jod aus seinen Salzen freigemacht werden kann. Wir dachten hierbei allerdings nur an die von Ehrlich gemachte Annahme einer Jodierung unter Mitwirkung der Nitrite; da die Gewebssäfte alkalisch reagieren, darf es als unmöglich bezeichnet werden, auf diesem Wege zu einer Abspaltung freien Jodes und damit zu Jodsubstitutionen zu kommen. Nun wurden wir durch Prof. Blum darauf aufmerksam gemacht, daß durch den elektrischen Strom auch in bicarbonat-alkalischem Milieu Jodsalze leicht gespalten werden, so daß freies Jod auftritt. Wird dem Drüsennerv (etwa analog der NaCl-Spaltung unter dem Einfluß der sekretorischen Magennerven) die Fähigkeit zur elektrolytischen Aufspaltung von Salzen zuerkannt, wie wir dies wieder-

[1]) Je mehr Alkali hierbei zugesetzt wird, desto mehr Eiweißabbauprodukte werden durch Aufspaltung frei, desto mehr wird aber auch das Jod an Alkali gebunden und daher die Entstehung von bloßen Jodsalzverbindungen begünstigt.

holt als wahrscheinlich hingestellt haben, so muß in der Tat zugegeben werden, daß hiermit eine Möglichkeit zur Entstehung von Jodsubstitutionen in der Drüse besteht.

Eine noch wichtigere Quelle für freies Jod ist aber im tierischen Organismus in der Anwesenheit von reichlichem aktivem Sauerstoff gegeben, d. h. in der oxydierenden Fähigkeit vieler Zellen, mit deren Chemismus wir uns in unserer Mitteilung VI näher beschäftigt haben. Da durch aktiven O Jodide leicht gespalten werden, muß diese Tatsache bei der Beurteilung der Jodierungsmöglichkeiten im Körper als sehr wesentlich in Betracht gezogen werden[1]).

Die im Organismus realisierten Verhältnisse gestatten somit nicht, die Frage nach der Art der Jodbindung an den Eiweißabbauprodukten in dem einen oder anderen Sinne zu entscheiden, da sowohl für Salzverbindung wie für Substitution geeignete Bedingungen gegeben sind. Wir haben deshalb versucht, auf andere Weise hierüber Aufschluß zu erhalten, indem wir die Extrahierbarkeit des Jodes resp. seiner Verbindungen aus Schilddrüsen- und aus anderem, in verschiedener Weise mit Jod behandeltem Eiweiß näher untersuchten.

Wird eine beliebige Eiweißlösung (Serum, Milch, Organpreßsäfte) mit JK versetzt und nach einiger Zeit mit 90°/₀ Alkohol wiederholt ausgekocht, das Koagulum mit Wasser mehrmals gekocht, um alle Peptide zu entfernen, so bleiben am Eiweiß selber nur Spuren von Jod zurück, in den im Kochwasser befindlichen Polypeptiden etwas mehr, während die Hauptmenge des Jodes im Alkohol angetroffen wird. Leitet man durch die mit Jodalkali versetzte Eiweißlösung einen galvanischen Strom, so daß sich die Flüssigkeit durch das freiwerdende Jod stärker gelb färbt und Jodsubstitution eintreten kann, so beobachtet man ein ganz gleiches Verhalten bei der Extraktion des Eiweißes mit Alkohol resp. kochendem Wasser. Beide Male wird somit ein fast jodfreies Koagulum erhalten; im ersten Falle ist, wie wir in früheren Arbeiten gezeigt haben,

---

[1]) Die Annahme einer „Jodase“ als einer besonderen, jodabspaltenden „Kraft“, wie sie Blum in seinen früheren Arbeiten gemacht hat, ist hierbei ebenso unnötig, wie diejenige von Oxydasen oder anderen oxydierenden Fermenten.

sicher ein Teil des Jodsalzes an die Eiweißbausteine „organisch“ gebunden worden, also sehr wahrscheinlich als Salzverbindung festgehalten, während im zweiten Fall reichliche Gelegenheit zu Jodsubstitution geschaffen war. Beide Jodverbindungen lassen sich durch die angegebene Behandlung nahezu vollständig aus dem Eiweiß entfernen.

Unterwirft man nun natives jodhaltiges Schilddrüsengewebe oder daraus gewonnenen Preßsaft einer gleichartigen Extraktion, so wird wohl ein wechselnder Betrag des Jodes (s. u.) im Alkohol erhalten, die Hauptmenge des Jodes dagegen im Koagulum angetroffen. Wir müssen daraus schließen, daß sich das Jod in der Drüse nicht bloß an ablösbare Eiweißbausteine gebunden, sondern in seiner Hauptmenge im Eiweiß eingebaut vorfindet.

Prot. 1. Je 20 ccm Schilddrüsenpreßsaft (Schwein), Milch und Serum (Mensch) werden mit 0,2 g JK und ca. 20 Tropfen $^n/_{10}$-Jodlösung versetzt, somit sowohl mit freiem wie an Alkali gebundenem Jod in größerer Menge beschickt und nach einiger Zeit mit heißem 90%igem Alkohol gefällt, das Koagulum hierauf im Wasser wiederholt ausgekocht und dieses Kochwasser sowie das ganz unlösliche Eiweißkoagulum auf Jod untersucht. Wir erhalten dadurch das im Eiweiß eingeschlossene, nicht herauslösbare Jod einerseits, das an Abbauprodukte „organisch“ gebundene Jod andererseits. Die Zahlen zeigen, daß im Koagulum aus Milch und Serum nur ganz geringe Mengen Jod, welches bei der Fällung mit eingeschlossen wurde, angetroffen werden, während die Hauptmenge des im wäßrigen Alkohol nicht mehr löslichen Jodes im Wasserkochextrakt erscheint. Bei Schilddrüse ist das Verhalten gerade umgekehrt. — Wird Schilddrüseneiweiß vorher jodiert (Zeile 2), so erhalten wir jetzt beim Auskochen der Alkoholfällung wohl größere Mengen jodierter Abbauprodukte als Zeichen der größeren Jodaffinität dieses Materiales, der Rückstand ist dagegen nicht reicher an Jod geworden, als er vorher war.

Material (je 20 g)	Behandlung	Jodgehalt Rückstand mg	Jodgehalt Kochwasser mg
Schilddrüsensaft (Schwein)	ohne Zusatz	0,5	Spuren
do.	jodiert	0,5	0,6
Milch	„	0,1	0,3
Serum (Mensch)	„	0,1	0,4

Der native (nicht mit Jod versetzte) Schilddrüsenpreßsaft enthielt in 20 g überhaupt nur 0,6 mg Jod; somit war fast alles in ihm enthaltene Jod unlöslich eingebaut.

Auch für diese eingebauten Jodverbindungen ist zunächst

nicht entscheidbar, ob Salzverbindungen oder Jodsubstitutionen vorliegen. Wir wissen von der Schilddrüse, daß sie infolge der besonderen chemischen Natur der ihr Eiweiß aufbauenden Peptide eine ungewöhnliche Affinität für Jodverbindungen besitzt. Werden einem Tier auch nur ganz geringfügige Jodmengen mit der Nahrung zugeführt, so nimmt die Drüse dieselben elektiv aus dem Blute auf und reichert sie in sich an, was namentlich bei kropfig veränderten Drüsen sehr deutlich ist und von Marine nicht nur im Tierversuch, sondern auch in vitro und an überlebenden Drüsen nachgewiesen wurde[1]. Man kann unmöglich annehmen, daß bei derartigen Versuchen das zugeführte Jod im Blut anders als in Form von Jodalkali kreist; wir müssen uns daher vorstellen, daß gewisse, im Drüsenzellplasma vorkommende Peptide in ausgesprochenem Maße die Fähigkeit besitzen, Jodsalze an sich zu binden.

Es wäre nun denkbar, daß derartig festgehaltene Salze bei der Synthese dieser Verbindungen zu Eiweiß mit eingebaut würden, da ja hierbei nicht alle NH_2-Gruppen verbraucht werden. Die experimentelle Prüfung dieser Frage scheint aber gegen diese Annahme zu sprechen. Wir haben untersucht, ob möglichst vollständig von seinen Abbauprodukten befreites Organeiweiß (Leber, Muskel, Blut) noch Cl-haltig ist, somit den Schluß auf einen Einbau von Chloriden zuläßt. Diese finden sich ja als Salzverbindungen sehr verbreitet im ganzen Organismus. Die bisherigen Versuche fielen ganz negativ aus, die mit heißem 90%igem Alkohol und kochendem Wasser extrahierten Organeiweißkörper erwiesen sich als Cl-frei. Es scheint daher vorläufig nicht wahrscheinlich, daß bei der Eiweißsynthese Chloride in nennenswerter Menge eingebaut werden; und was für die Chlorsalze gilt, dürfte wohl auf die Jodide übertragbar sein.

Die älteren Versuche über den Aschengehalt der Eiweißkörper (Hammarsten 0,35%, Gürber, Michel 0,2 bis 0,7% usw.) wurden, soviel uns bekannt ist, stets nur an ungenügend gereinigten Präparaten ausgeführt, die noch größere oder geringere Mengen von Abbauprodukten enthielten; sie können deshalb über die uns hier beschäftigende Frage nichts

---

[1]) Journ. of Pharmac. and experim. Ther. 7, 557, 1915. Journ. of Biolog. Chem. 22, 547, 1915. Proc. Soc. f. experim. Biol. and Med. 12, 1915.

aussagen. Eine nähere Untersuchung über den Gehalt der in der angegebenen Weise gereinigten Eiweißkörper an den wichtigsten Salzen sei einer späteren Arbeit vorbehalten.

Die eben erwähnten Befunde machen es somit wahrscheinlich, daß das zunächst in Salzform gebundene Jod in der Schilddrüse vermutlich infolge von Oxydationsvorgängen frei gemacht und hierauf in geeignete Eiweißbausteine substituiert wird, in welcher Form es bei der Eiweißsynthese eingebaut wird. Es braucht daher anscheinend drei Faktoren, um zu diesem Jodeinbau zu führen: 1. Jodalkaliaffinität der Bausteine, um das Jodsalz aus dem Blut in den Drüsenzellen festzuhalten. 2. Oxydationsvorgänge (an Kolloidoberflächen aktivierter O_2), die aus dem Salz das Jod frei machen. 3. Zu Jodsubstitution geeignete Bausteine, die nach ihrer Jodierung in der Zelle synthetisch verwertet werden.

Diese dreifache chemische Forderung läßt einigermaßen verstehen, warum nicht beliebige Organe, sondern bloß die Schilddrüse die Eigenschaft besitzt, Jod im Eiweiß ihrer Zellen einzuschließen. Nach älteren Arbeiten, auf die wir uns in unserer Mitteilung III noch gestützt hatten, sollten alle Organe Jod enthalten, wenn auch in deutlich geringerer Menge als die Schilddrüse (s. spez. Justus, Virchows Archiv **176**, 1903). Eine Nachprüfung dieser Angaben hat jedoch gezeigt, daß dieselben wenigstens für unsere Gegenden (verschiedene Teile der Schweiz) unzutreffend sind, und daß es die Schilddrüse so gut wie ausschließlich ist, die sich unter allen Organen durch ihren Jodgehalt auszeichnet[1]). Selbst in größerer Menge künstlich zugeführtes Jod bringt im Tierkörper keine irgend deutliche Jodspeicherung zustande. So haben wir an junge, wachsende Ratten je 2 bis 3 Wochen hindurch täglich mit JK versetzte Milch verfüttert, anderen JK täglich oder Jodostarin (Roche) in 3- bis 4tägigen Zwischenräumen subcutan injiziert. Die einige Tage nach der letzten Jodverabreichung getöteten Tiere ergaben keinen deutlichen Jodgehalt in Leber, Niere, Muskel, Keimdrüsen. Selbst Fütterung mit jodierter Milch (JK $^1/_2$ %$_0$ in Milch, die hierauf 10 bis 15 Minuten der Einwirkung eines

---

[1]) Die näheren Angaben über diese Versuche bilden den Inhalt einer im Druck befindlichen Dissertation (Rietmann).

schwachen galvanischen Stromes ausgesetzt wird; es tritt deutlich Gelbfärbung ein) hat nach 16 Tagen bei wachsenden Ratten nur dasselbe negative Resultat ergeben. Die verfütterten jodsubstituierten Abbauprodukte waren somit in den Organen nicht als solche eingebaut worden. Auch wenn Bakterien oder Blastomyceten in Bouillon gezüchtet wurden, die an Stelle von NaCl entsprechende Mengen von NaJ enthielt, gelang es uns nicht, ein jodhaltiges Eiweiß zu erzielen.

Aus allen diesen Beobachtungen geht hervor, daß die Fähigkeit zum Jodeinbau in noch höherem Maße für die Schilddrüse charakteristisch ist, als dies bisher angenommen wurde[1]).

Was ergibt sich aus diesen Feststellungen für die Frage nach der Rolle des Jodes bei der Funktion der Schilddrüse? Sie dürften zunächst unsere schon früher ausgesprochene Ansicht erhärten, daß das Jod kein unerläßlicher und wesentlicher Bestandteil des Sekretes ist. Die Tatsache, daß der größere Teil desselben fest im Drüseninnern eingebaut ist, so daß er dem Stoffwechsel ganz entzogen ist und erst dann frei werden kann, wenn dieses Eiweiß autolytisch zerfällt; der Umstand, daß die Drüse normalerweise (also auch bei nichtkropfigen Individuen) nie mit Jod abgesättigt ist, so daß sie auf künstliche Jodzufuhr diesen Stoff begierig in sich aufnimmt; diese und die in unserer früheren Arbeit gesammelten Argumente sprechen wohl deutlich genug dafür, daß das konstant abgegebene Sekret nicht jodhaltig sein noch erst durch seinen Jodgehalt seine besondere physiologische Wirkung erlangen kann. Daß natürlich beim Zerfall des Drüseneiweißes (der Kolloidbildung) auch jodhaltige Bausteine in dieses „Sekret", gelangen müssen, ist selbstverständlich; wir geben auch zu daß stärker jodhaltige Drüsen besser wirksame Extrakte und Thyreoidpräparate geben können, wie dies aus manchen Arbeiten

[1]) Die an Meeresorganismen vorliegenden Untersuchungen gestatten ebenfalls kein Urteil über die Art der Jodbindung, da auch sie nicht an abbauproduktfreiem Eiweiß gemacht wurden. Bei höheren Lebewesen wäre es von Interesse, zu untersuchen, ob nicht doch durch längere, evtl. durch Generationen fortgesetzte Jodzufuhr (namentlich in Form jodierter Bausteine) eine Jodbindung nach Art der Schilddrüse auch in anderen Organen eintreten würde.

hervorzugehen scheint[1]). Damit ist ja keineswegs gesagt, daß diese Drüsen wegen ihres Jodgehaltes besser wirken, sondern bloß die aus zahlreichen experimentellen und klinischen Erfahrungen bekannte Tatsache bestätigt, daß das Jod für den Stoffumsatz der Drüse selbst von Belang ist. Die reichliche Bildung von Kolloid in vorher kolloidarmen, kropfig veränderten Drüsen, die Verschmälerung des Zellplasmasaumes der Follikel und die Verfestigung der ganzen Zellstruktur, wie sie auf Jodzufuhr eintritt, beweisen, daß dieses Salz zunächst eine Autolyse des angesammelten Eiweißes herbeiführt und daher sekretionssteigernd wirkt. Das Jod beeinflußt somit in deutlicher Weise die Abgabe des Sekretes, die bekannten Tatsachen gestatten aber nicht den Schluß, daß das Sekret jodhaltig sein muß, um zu wirken.

Bei der Extraktion von Schilddrüsenpreßsaft oder Autolysaten mit Alkohol spielt der Wassergehalt des Alkohols, resp. der erhaltenen Mischung eine große Rolle. Je mehr Wasser zugegen ist, desto eher bleiben gewisse, schwerlösliche Verbindungen im Abguß gelöst. Hierzu gehören nun gerade die jodhaltigen Bausteine des Drüseneiweißes, so daß der Jodgehalt derartiger Extrakte durch die Menge und den Wassergehalt des zur Fällung verwendeten Alkohols wesentlich mit beeinflußt wird. Dies sei namentlich im Hinblick auf die von uns angegebene Darstellung von jodfreien Lösungen niederer Thyreoidbausteine hervorgehoben; wird hierbei nicht die angegebene Technik (Zusatz von 4- bis 5fachen Volumen absoluten [nicht bloß 90%!] Alkohols) befolgt, so werden, wie die folgenden Protokolle zeigen, leicht noch jodhaltige Lösungen erhalten. (In vereinzelten Fällen ist selbst der mit absolutem Alkohol gewonnene Extrakt noch etwas jodhaltig.) Aus der Nichtextrahierbarkeit des Jodes mit gewissen Lösungsmitteln wie Alkohol, Aceton usw. bestimmte Schlüsse auf eine „besondere" Art der Bindung des Jodes in der Schilddrüse zu machen, scheint uns dagegen nicht möglich; jedenfalls spielt, wie wir

[1]) Lenhart, Journ. of experim. Med. 22, 1915. (Versuche an Kaulquappen.) Der Gehalt an Jod und die experimentelle Wirksamkeit gehen aber keineswegs immer parallel; vermutlich ist der höhere Kolloidgehalt (d. i. Gehalt an leicht aufspaltbarem Material) hierbei nicht unwichtig. Von Interesse wären Versuche mit solchen Präparaten, die nur eingebautes Jod enthalten.

sehen, der Wassergehalt der Mischung hierbei eine oft wichtigere Rolle als die Natur des Extraktionsmittels.

Prot. 2. Preßsaft (frisch oder nach 1- bis 3tägiger Autolyse im Brutschrank, im letzteren Fall āā mit Bicarbonatlösung verdünnt) wird in jeweils gleicher Menge mit dem 5fachen Volumen 90 oder 100%igem Alkohol gefällt und sowohl das Filtrat wie der Filterrückstand auf Jod untersucht. Die Angaben bedeuten Milligramm pro 100 g verarbeiteten Saftes.

Material		Fällung mit Alkohol 90%	Fällung mit Alkohol 100%
Rinderschilddrüse	Filtrat	3,0 mg	0,0 mg
Preßsaft	Rückstand	15,0 "	17,0 "
Schweineschilddrüse	Filtrat	2,1 "	0,0 "
Preßsaft	Rückstand	8,5 "	10,2 "
Dasselbe, 3 Stunden	Filtrat	4,1 "	1,3 "
autolysiert	Rückstand	4,8 "	7,3 "
Rinderschilddrüse	Filtrat	12,0 "	0,0 "
Autolysat.	Rückstand	9,0 "	23,0 "

Zusammenfassung.

1. Das Jod ist in der Schilddrüse nicht nur an die Abbauprodukte der Eiweißoberflächen gebunden, sondern zum größeren Teil im Innern des Zelleiweißes „eingebaut“. Dies ist nur dadurch möglich, daß die zur Synthese des Eiweißes verwendeten Bausteine vorher jodiert wurden. Das im Blut als Jodalkali kreisende Jod wird vermutlich von gewissen stark jodsalzaffinen Peptiden elektiv in die Zellen gezogen und zunächst als Salzverbindung festgehalten; hierauf dürfte durch Oxydationsvorgänge („aktiver“ Sauerstoff!) das Jod aus seinen Salzen abgespalten und in geeignete Eiweißbausteine substituiert werden. Es ist nicht wahrscheinlich, daß bei der Eiweißsynthese Salze als Salzverbindungen der Aminosäuren eingebaut werden und daß speziell das Jod der Schilddrüse als Alkalisalzverbindung vorkommt.

2. Bei der Extraktion von Drüsenpreßsaft oder Autolysat mit Alkohol ist der Wassergehalt des letzteren von Wichtigkeit. Wird an Stelle von absolutem Alkohol 90%iger Alkohol verwendet, so erscheint ein bald größerer, bald kleinerer Teil der jodhaltigen Abbauprodukte im Extrakt.

3. Die mitgeteilten Versuchsergebnisse sprechen neben den anderen bekannten Tatsachen dafür, daß das Jod kein wesentlicher Bestandteil des Schilddrüsen-Sekretes ist.

Über die Diazoreaktion des normalen Menschenharnes und die Abhängigkeit des „Diazowertes" von der Ernährungsart.

Von

Otto Fürth.

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Institutes der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 26. Mai 1919.)

I.

Allgemeine Charakteristik der Diazochromogene.

Wir müssen beim Studium der Diazoreaktion des Harnes zwei verschiedene Dinge wohl auseinanderhalten: Die Diazoreaktion pathologischer Harne nach Ehrlich einerseits und die auch dem normalen Harne eigentümliche Diazoreaktion nach Penzoldt-Pauly andererseits.

Die von Ehrlich[1]) angegebene Farbenreaktion des Harnes, der bei gewissen Infektionskrankheiten (wie z. Typhus abdominalis und exanthematicus, Masern) bekanntlich eine diagnostische, bei der Lungentuberkulose auch eine prognostische Bedeutung zugeschrieben wird, basiert, wie aus den Arbeiten von M. Weiß[2]) hervorgeht, darauf, daß das Urochromogen (die Vorstufe des normalen gelben Harnfarbstoffes, der sich auf oxydativem Wege leicht in Urochrom umwandelt) mit Diazoverbindungen der aromatischen Reihe nach Zusatz von Ammoniak rote Farbstoffe gibt.

---

[1]) P. Ehrlich, Zeitschr. f. klin. Med. 5, 285, 1882.

[2]) M. Weiß (Heilanstalt Alland), Wiener klin. Wochenschr. **1907**, Nr. 31; Beitr. z. Klin. der Tuberkulose 8, 117, 1907; derselbe (Chem. Abt. d. Physiol. Inst. der Wiener Universität), diese Zeitschr. **30**, 333, 1910; **81**, 342, 1917; Sitzungsber. d. Wiener Akad. 122, Abt. II, Januar 1913.

Eine Schätzung der relativen Menge dieses Chromogens ist auf zweierlei Weise möglich. Man führt dasselbe durch Permanganatzusatz in Urochrom über und bestimmt entweder die Zunahme der Färbung durch Vergleich mit einer Echtgelblösung von bestimmtem Titer; oder man benutzt die Menge $^{n}/_{100}$-$KMnO_4$-Lösung, die eben erforderlich ist, um alles Chromogen in Urochrom überzuführen, als relatives Maß. Weiß hat ferner angegeben, daß das Urochromogen pathologischer Harne (das im normalen Harne fehlt) einen Bestandteil der Oxyproteinsäurefraktion des Harnes bildet[1]).

Von diesem pathologischen Diazochromogene (dem Urochromogen) anscheinend grundverschieden ist nun das durch die Penzoldt-Paulysche Reaktion[2]) (Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure in sodaalkalischer Lösung) in jedem, also auch im normalen Harne nachweisbare Diazochromogen. Und dieses letztere ist es, mit dem wir uns in vorliegender Untersuchung eingehender befassen wollen[3]).

Bei Beurteilung des Wesens der letztgenannten Reaktion muß man sich zunächst die Tatsache vergegenwärtigen, daß im Harn (außer dem Urochromogen) Oxyphenylderivate auftreten können, die mit Diazokörpern Farbenreaktion geben; so nach Clemens das Tyrosin, die p-Oxyphenylessigsäure und die p-Oxyphenylpropionsäure.

Nun kommen nach Kutscher[4]) und Engeland[5]) aber auch noch andere Diazochromogene im Harn vor. „Entfernt man die aromatischen Oxysäuren aus dem Harn", sagt Kutscher, „indem man denselben bei saurer Reaktion mit Äther erschöpft, dann gibt der mit Äther nicht lösliche Anteil

[1]) M. Weiß, diese Zeitschr. 81, 354, 1917.

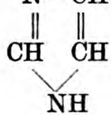
[2]) F. Penzoldt, Berl. klin. Wochenschr. 1883, Nr. 14; H. Pauly, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 516, 1904.

[3]) Bei Anwendung krystallisierter Diazobenzolsulfosäure in wäßriger Lösung hat Penzoldt in den meisten Fällen mit dem Harne Gesunder und Kranker eine schöne bordeauxrote Färbung erhalten, während dieselben Harne bei Anstellung der Reaktion nach der Ehrlichschen Vorschrift sich nur gelb oder rotgelb färbten.

[4]) F. Kutscher, Sitzungsber. Ges. Naturwiss. Marburg 4, 83, Mai 1908.

[5]) R. Engeland (Physiol. Inst. Marburg), Münchener med. Wochenschr. 1908, 1643; Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 58ff., 1908.

doch noch kräftige Diazoreaktion. Es müssen also im Harn außer den vom Benzolkern des Eiweißes sich herleitenden aromatischen Oxysäuren noch andere Körper vorhanden sein, die ebenfalls in sodaalkalischer Lösung mit Diazobenzolsulfosäure unter Bildung roter Produkte reagieren. Bezüglich dieser bisher unbekannter Körper hat sich ermitteln lassen, daß sie sich wahrscheinlich auf den im Eiweiß vorhandenen Imidazolkern N—CH zurückführen lassen."



Bei Verarbeitung von 40 l Harn konnte Engeland durch Fällung mit heißgesättigter Quecksilberchlorid- und Natriumacetatlösung, sowie durch weitere Fraktionierung mit alkoholischer Chlorcadmiumlösung, ferner mit Silbernitrat bei vorsichtigem Zusatz von Ammoniak eine geringe Menge einer krystallisierten Substanz erhalten, die durch Schmelzpunkt, Farbenreaktionen, sowie durch die Analyse ihres Pikrolonates als Histidin identifiziert wurde.

„Außerdem", sagt Kutscher, „wurde im Harn auch eine Base gefunden, die wahrscheinlich als Imidazolaminoessigsäure anzusprechen ist. Weiter ließ sich als gut krystallisierendes Goldsalz ein Körper gewinnen, für den sich die Formel $C_{15}H_{36}N_8O_{13}$ berechnen ließ. Auch er muß zum Imidazolkern des Eiweißes in naher Beziehung stehen, denn er gab die Farbenreaktionen des Histidins in sehr ausgesprochener Weise."

„Außer diesen krystallinisch gewonnenen Imidazolderivaten wurden noch Substanzen erhalten, die man, wie die bisher aufgeführten, durch Phosphorwolframsäure, sowie Silbernitrat und Barytlösung niederschlagen konnte. Auch sie gaben prachtvolle Rotfärbung mit Diazobenzosulfosäure bei sodaalkalischer Reaktion. Trotzdem sie sich bisher nicht in analysierbare Form haben bringen lassen, werden wir wohl nicht fehlgehen, in ihnen ebenfalls Abkömmlinge des Eiweißes zu suchen, die durch den Imidazolring ausgezeichnet sind, an dem die Diazoreaktion haftet."

Auch die rätselhafte, zuweilen im Hundeharn auftretende „Urocaninsäure" soll nach A. Hunter angeblich ein Imidazolderivat sein und sich vom Histidin durch Ammoniakabspaltung ableiten[1]).

Ein genaueres Studium der physiologischen und pathologischen Bedeutung der Diazochromogene des Harnes ist durch das von M. Weiß und N. Ssobolew ausgearbeitete

---

[1]) A. Hunter (Cornell Univers.), Journ. of biol. Chem. **11**, 537, 1912.

colorimetrische Bestimmungsverfahren[1]) angebahnt worden. Es hat sich ergeben, daß mit Hilfe der Farbenreaktion mit Diazobenzolsulfosäure unter Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen nicht nur freies Histidin als solches, sondern auch gebundenes Histidin [z. B. das im Carnosin des Muskels an Alanin gebundene Histidin[2])] quantitativ bestimmt werden kann. Auch die Diazoreaktion des Harnes kann mit Hilfe dieses Verfahrens messend verfolgt werden, wobei man die Rechnung so ausführt, als ob das Diazochromogen freies Histidin wäre. Der so erhaltene „Diazowert" ist jedoch nur als colorimetrischer Hilfswert zu verstehen. Denn weder durfte es von vornherein für bewiesen gelten, daß hier ausschließlich Histidin, nicht aber auch Oxyphenylkomplexe in Betracht kommen, noch aber war es wahrscheinlich, daß die Histidinkomplexe sich ganz oder auch nur zum größten Teil in ungebundenem Zustand befinden.

Tatsächlich ist M. Weiß[3]) auf Grund von Fraktionierungsversuchen zu der Überzeugung gelangt, daß die Diazoreaktion des normalen und pathologischen Harnes sicherlich nicht im wesentlichen durch freies Histidin oder Tyrosin und ebensowenig durch Oxyphenylderivate bedingt sei. Der Hauptanteil derselben ist vielmehr an die Oxyproteinsäurefraktion des Harnes geknüpft. Die sowohl durch Silberbarytfällung als auch durch Quecksilberacetatfällung bei sodaalkalischer Reaktion fällbaren Diazochromogene fanden sich in der „Barytfraktion" wieder, die die Gesamtheit jener alkohollöslichen Säuren umfaßt, deren Barytsalze zwar in Wasser löslich, jedoch durch Alkohol fällbar sind.

Weiterhin vermochte nach M. Maßlow[4]) im Wiener physiologischen Institut durch eine an Hunden bei verschiedenartiger Ernährung durchgeführte Versuchsreihe zu zeigen, daß die Ausscheidung der Diazochromogene im Hundeharn von

---

[1]) M. Weiß und N. Ssobolew (Chem. Abt. des Physiol. Inst. d. Wiener Universität), diese Zeitschr. 58, 119, 1913.

[2]) O. v. Fürth und Th. Hryntschak (Chem. Abt. d. Physiol. Inst. d. Wiener Universität), diese Zeitschr. 64, 177—178, 1914.

[3]) M. Weiß, l. c. diese Zeitschr. 81, 354, 1917.

[4]) M. Maßlow (Chem. Abt. d. Physiol. Inst. der Wiener Universität), diese Zeitschr. 70, 306, 1915.

der Menge der im Nahrungseiweiß und im Carnosin der Fleischnahrung enthaltenen Histidinkomplexe unabhängig ist und daß nicht etwa die mit der Nahrung eingeführten Histidinmengen im Harn zum Vorschein kommen. Dagegen spricht ein inniger Zusammenhang und Parallelismus zwischen der Ausscheidung der Diazochromogene und dem Gesamteiweißumsatz des Organismus für einen endogenen Ursprung derselben.

Dem Gesagten zufolge erscheint nunmehr die Frage der Diazochromogene des Harnes als ein Teilstück jener großen Gruppe von Stoffwechselproblemen, die die Oxyproteinsäuren und ihre physiologische Rolle und Bedeutung betreffen.

Wenn die wissenschaftliche Erforschung dieser sowohl in physiologischer als in pathologischer Hinsicht sehr bedeutsamen Gruppe von Eiweißderivaten bisher nur langsam von der Stelle zu rücken vermochte, so liegt das wohl hauptsächlich an dem Umstand, daß die Abtrennung derselben sich außerordentlich mühsam und kostspielig gestaltet hat. Ich habe nun kurz vor Kriegsausbruch das Verfahren der Darstellung und Bestimmung der Oxyproteinsäuren wesentlich vereinfacht und, wie ich glaube, verbessert. Ich beseitige nämlich die Hauptschwierigkeit, die sich für die Fällbarkeit der Oxyproteinsäuren aus der Anwesenheit des Harnstoffes ergibt, dadurch, daß ich den gesamten Harnstoff des Harnes durch Vergärung mit Sojaurease (einem aus Sojabohnen bereiteten Ferment) von vornherein vollständig beseitige.

Ich war so in der Lage, größere Mengen normalen Menschenharnes nach der neuen Methode auf „Barytfraktion" zu verarbeiten und so ein ausreichendes Ausgangsmaterial zu gewinnen, um in der Frage der Diazochromogene des Harnes einen Schritt weiter zu gehen, als man bisher gegangen war. Ich habe mir insbesondere die Frage vorgelegt, ob, nachdem man die Oxyproteinsäurefraktion einer vollständigen Hydrolyse unterworfen hat, das Diazochromogen nunmehr etwa als Histidin als solches oder doch als eine dem Histidin insoweit ähnliche Substanz vorhanden sei, daß dieselbe durch ihr reaktionelles Verhalten als Imidazolderivat charakterisiert erscheint.

Nach Beantwortung dieser Frage habe ich weiterhin versucht, mit Hilfe der colorimetrischen Methode von Weiß und

Ssobolew den „Diazowert“ verschiedener normaler und pathologischer Harne zum Eiweißumsatz in Beziehung zu bringen. Im Institut auf Durigs Veranlassung ausgeführte Stoffwechselversuche, die die Stickstoffausscheidung bei chronischer eiweißarmer Unterernährung[1]) auf Grund von Beobachtungen über die Ernährungsverhältnisse in Wien während des letzten Kriegsjahres[2]) zum Gegenstand hatten, lieferten mir in dieser Hinsicht wertvolles Material. Ich habe dasselbe weiterhin durch die Untersuchung des Harnes von Kranken ergänzt, die an Kachexien der verschiedensten Art litten und bei denen, der Natur ihrer Leiden gemäß, eine weitgehende Einschmelzung ihres Körpereiweißbestandes angenommen werden konnte.

II.

Fraktionierung der hydrolysierten „Barytfraktion“.

Ich möchte nunmehr zunächst über meine Versuche berichten, das Diazochromogen des normalen Harnes aus der die Gesamtheit der Oxyproteinsäuren umfassenden Barytfraktion herauszufraktionieren. Kurz vor Kriegsausbruch hatte ich mit Hilfe des vorerwähnten vereinfachten Verfahrens zur Abtrennung der Oxyproteinsäurefraktion[3]) 100 l Harn verarbeitet. Das Verfahren beruht darauf, daß der gesamte Harnstoff durch Vergärung mit Sojaurease von vornherein beseitigt, das entstandene Ammoniumcarbonat in Ammonsulfat übergeführt, dieses jedoch durch Alkoholbehandlung und mit Hilfe von Ätzbaryt beseitigt wird. Aus dem mit Kieselgur zur Trockene gebrachten Filtrat werden alle in heißem Alkohol löslichen Substanzen beseitigt. So erhält man schließlich die „Barytfraktion“ (A), d. i. die Fraktion der in Wasser löslichen, jedoch durch Alkohol fällbaren Barytsalze der Harnbestandteile von saurem Charakter.

Ein kleiner Teil des Präparates hatte mir für Stoffwechseluntersuchungen gedient, über die bei anderer Gelegen-

[1]) A. Durig, Antrittsvorlesung, gehalten am 31. Oktober 1918, Wiener med. Wochenschr. 1918, Nr. 44. Separat: Verlag von Moritz Perles, Wien.

[2]) Klara Kohn (Chem. Abt. d. Physiol. Inst. d. Wiener Universität), Wiener klin. Wochenschr. 1919, Nr. 6.

[3]) O. v. Fürth, diese Zeitschr. 69, 448, 1915.

heit berichtet werden soll. Die Hauptmenge des Präparates war jedoch noch intakt und, trotz vierjähriger Aufbewahrung, anscheinend nicht verändert. Beim starken Einengen der wäßrigen Lösung schied sich massenhaft Bariumchlorid ab; nach Abtrennung desselben wurde auf 2 l eingeengt. Die so erhaltene schwarzbraune Lösung (0,92 $^0/_0$ N enthaltend) diente mir als Ausgangsmaterial für meine Fraktionierungsversuche.

Die Lösung gab noch nach vielfacher Verdünnung eine sehr schöne und intensive Paulysche Diazoreaktion. Die colorimetrische Bestimmung nach Weiß und Ssobolew[1]) ergab erst bei 30facher Verdünnung eine Färbungsintensität, die derjenigen der Standardlösung von Histidinmonochlorid 0,01 $^0/_0$ gleichkam. Der Diazowert der Barytfraktion, ausgedrückt als Histidinmonochlorid, war sonach mit 0,30 $^0/_0$ zu bewerten. Es entspricht dies 0,06 $^0/_0$ Histidinstickstoff (Histidinmonochlorid $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl + H_2O$ enthält 20,02 $^0/_0$ N). Vom Gesamt-N der Barytfraktion entfielen sonach nur 6,5 $^0/_0$ auf Histidin-N, der ganze Rest aber auf andere N-haltige Substanzen (Eiweißderivate), die keine Diazorektion zu geben befähigt sind.

Ich mußte mir, bevor ich an meine Fraktionierungsversuche heranging, noch die Frage vorlegen, ob nicht etwa meine Resultate dadurch eine Trübung erfahren konnten, daß ich mit der Sojafermentlösung selbst, die ja ihrerseits eiweißartige Substanzen enthielt, Diazochromogene eingeführt hatte. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die Fermentlösung[2]) nur geringe Spuren von Diazochromogenen enthielt, die neben denjenigen der Barytfraktion völlig verschwanden.

Versuch 1.

Schwefelsäurehydrolyse; Phosphorwolframsäure- und Sublimatfällung.

400 ccm meiner Stammlösung („Barytfraktion A") wurden auf das halbe Volumen eingeengt, mit ca. 60 g konzentrierter Schwefelsäure versetzt und 16 Stunden lang unter Rückflußkühlung gekocht. Nach Verdünnung auf 1 l und Beseitigung harziger Abscheidungen wurde das klare rotbraune Filtrat so lange mit 20 $^0/_0$ Phosphorwolframsäure versetzt, als eine Probe des fünffach verdünnten Filtrates bei Mehrzusatz eines Tropfens des Reagens noch eine Fällung gab. Der voluminöse Niederschlag wurde abgenutscht, mit Wasser verrieben, mit feingepulver-

---

[1]) l. c.

[2]) Die Fermentlösung wurde nach dem in dieser Zeitschr. 69, 452, 1915 beschriebenen Vorgange hergestellt.

tem Ätzbaryt bei Zimmertemperatur zerlegt, das sich reichlich entwickelnde Ammoniak durch Eindampfen vertrieben, der Barytüberschuß mit Kohlensäure beseitigt, aufgekocht, heiß filtriert und eingedampft. Der so erhaltene Sirup ließ auch bei langdauerndem Stehen im Exsiccator über Schwefelsäure keinerlei Krystallisationsneigung erkennen. Der colorimetrische Vergleich ergab, daß die Hauptmenge des Diazochromogens sich in der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Fraktion, ein der Fällung entgangener Rest allerdings auch im Filtrat vorfand.

Dieses Verhalten erinnert an dasjenige des Histidins gegenüber der Phosphorwolframsäure: dasselbe kann durch dieses im allgemeinen so wirksame Fällungsmittel nur schwer vollständig gefällt werden, da der Niederschlag im Überschuß desselben ziemlich leicht wieder in Lösung geht.

Die aus der PWS-Fällung gewonnene Hauptfraktion wurde nunmehr durch Schwefelsäure von Baryt befreit und mit einem Überschuß kaltgesättigter Sublimatlösung unter Zusatz von Natronlauge bis zum Eintritt ganz schwach alkalischer Reaktion ausgefällt. Dabei wurde das Diazochromogen wiederum seiner Hauptmenge nach niedergeschlagen. Der Niederschlag wurde auf einem gehärteten Saugfilter sehr gründlieh mit Wasser ausgewaschen (wobei etwas von dem Chromogen mit dem Waschwasser verloren ging), schließlich in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die so erhaltene Lösung auf das Volumen von 200 ccm gebracht.

Die so erhaltene Lösung von gelber Farbe und saurer Reaktion zeigte folgendes Verhalten:

Sie gab eine schöne Diazoreaktion mit dunkelcarminroter Färbung. Die colorimetrische Auswertung derselben nach Weiß und Ssobolew verglichen mit dem N-Gehalte, ergab, daß es sich keinesfalls um reines Histidin handeln könne, daß vielmehr nur etwa die Hälfte des N-Gehaltes einem Histidinkomplexe, bzw. einer dem Histidin colorimetrisch gleichwertigen Substanz entspreche.

Die Lösung wurde bei saurer Reaktion von Quecksilberchloridlösung nicht gefällt, vielmehr erst auf Alkalizusatz; dagegen gaben Mercurisulfat und -acetat beim Stehen zunehmende Trübungen, Mercurinitrat direkt eine nicht sehr reichliche flockige Fällung. Wäßerige gesättigte Pikrinsäurelösung gab keinen Niederschlag. Dagegen fiel auf Zusatz einer alkoholischen Pikrolonsäurelösung (die bei Zusatz zu einer gleichen Wassermenge höchstens eine geringe, langsam zunehmende Trübung aufwies) sogleich ein sehr voluminöser, bräunlichgelber, grobflockiger Niederschlag aus, der jedoch, auf einem gewogenen Filter gesammelt, seiner Menge nach nicht etwa der (dem colorimetrischen Verhalten entsprechend) erwarteten Histidinmenge, vielmehr nur einem Bruchteile derselben entsprach. Der ausgewaschene Niederschlag wurde in Alkohol gelöst, die Lösung mit Wasser versetzt und bei Zimmertemperatur eingedunstet, wobei sich die Substanz in Form rundlicher Körner ohne ausgeprägte Krystallform ausschied. Eine

Suspension derselben in verdünnter Sodalösung mit einer frisch bereiteten Lösung von Diazobenzolsulfosäure (nach Pauly) versetzt, gab eine intensive Rotfärbung (Pikrolonsäure als solche reagiert nicht).

2. Versuch.

Schwefelsäure-Hydrolyse; Sublimatfällung; Fraktionierung mit Silberbaryt, Quecksilbersulfat und mit ammoniakalischem Silber.

α) Sublimatfällung. 400 ccm der Stammlösung („Barytfraktion A") wurden zum Sirup eingeengt und der massenhaft auskrystallisierende anorganische Salzrückstand mit wenig Wasser abgetrennt, die schwarzbraune Flüssigkeit mit Schwefelsäure von Barium befreit, auf 250 ccm gebracht, mit 63 g konz. Schwefelsäure versetzt, sodann im Rundkolben 18 Stunden lang unter Rückflußkühlung am Babobleche in lebhaftem Kochen erhalten. Sodann wurde in einer geräumigen Schale mit Natriumcarbonat in Substanz neutralisiert, die ausfallende Masse von Natriumsulfat durch Wasserzusatz in Lösung gebracht und die Flüssigkeit schließlich mit einem Überschuß von Quecksilberchlorid (500 ccm $HgCl_2$ 7 %) unter Zusatz von Natriumcarbonat ausgefällt. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit Wasser gewaschen, vom Filter genommen, mit Wasser verrieben, neuerlich abgenutscht, schließlich in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Der Quecksilbersulfidniederschlag wurde mit Wasser ausgekocht und die Flüssigkeit auf das ursprüngliche Volumen (400 ccm) eingeengt.

Die Ermittelung des N-Gehaltes und des colorimetrischen Diazowertes ergab, daß diese „Histidinfraktion" annähernd die Gesamtmenge des in der Barytfraktion enthaltenen Diazochromogens enthielt. Daß es sich aber nicht etwa um reines Histidin handeln konnte, ergab sich schon aus dem Umstande, daß sich nur etwa ein Viertel (27 %) des Gesamt-N colorimetrisch als „Histidin-N" vorfand. Immerhin bedeutet dies gegenüber der ursprünglichen Barytfraktion eine Anreicherung auf das Vierfache.

Die „Histidinfraktion" hinterließ beim Eindunsten einen braunen Sirup, der bei Extraktion mit Alkohol braune Flocken ungelöst zurückließ, während die Hauptmenge mit rotbrauner Farbe in Lösung ging. Zusatz von Aceton erzeugte darin eine reichliche sirupöse Fällung; die Hauptmenge des Diazochromogens fand sich jedoch nicht in dieser letzteren, vielmehr in der überstehenden hellgefärbten Alkohol-Acetonös ung. Dieselbe hinterließ beim Eindunsten einen Rückstand, der, in wenig Wasser aufgenommen und in das Vakuum über Schwefelsäure gestellt, keinen Ansatz zur Krystallisation erkennen ließ.

β) Silberbarytfällung. Ich versuchte nunmehr die Hauptmenge meiner „Histidinfraktion" jenem bekannten Silberbarytfraktionierungsverfahren zu unterwerfen, dessen sich Kossel mit so gutem Erfolge zum Zwecke der Abtrennung gerade des Histidins bedient hatte.

Die Lösung wurde mit so viel einer 10 %igen Silbernitratlösung versetzt, bis die Tüpfelprobe auf dem Uhrglase gegen Barytwasser einen

Silberüberschuß anzeigte. Es wurde nunmehr Barytwasser bis zum Eintritte deutlich alkalischer Reaktion hinzugefügt, sodann mit einigen Tropfen Salpetersäure genau neutralisiert. Es fiel ein voluminöser brauner Niederschlag aus, der die Hauptmenge des Diazochromogens einschloß (ein Anteil des Chromogens fand sich allerdings noch im Filtrate und fiel aus demselben bei Mehrzusatz von Barytwasser aus). Der Niederschlag wurde auf einem Nutschfilter mit schwach barythaltigem, sodann kurze Zeit mit reinem Wasser sorgfältig ausgewaschen, in Wasser verteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt.

Die colorimetrische Untersuchung ergab, daß in dieser Fraktion 44 % des Gesamt-N auf „Histidin-N" entfielen. Die Eigenfärbung der Fraktion erschien, verglichen mit der schwarzbraunen Färbung der ursprünglichen Barytfraktion, erheblich vermindert und es ergab sich ohne weiteres, daß von einer Proportionalität zwischen Färbungsintensität und Diazochromogen keine Rede sein konnte und daß das letztere nicht etwa mit den Harnfarbstoffen identisch sei.

Die Fraktion gab die Paulysche Reaktion mit schöner satter, bläulichroter Färbung, die auf Salzsäurezusatz in ein kochbeständiges Gelbrot umschlug. Beim Kochen der salzsauren Lösung mit Zinkstaub erfolgte Entfärbung zu weingelb, bei weiterem Zusatze von Ammoniak Umschlag in goldgelb.

Silbernitrat unter Zusatz von Ammoniak gab eine im Überschusse von Ammoniak sehr leicht lösliche Fällung des Diazochromogens.

Alkoholische Pikrolonsäurelösung gab einen voluminösen, in viel Alkohol löslichen, grobflockigen Niederschlag. Der Vergleich mit einer Histidinlösung von gleichem colorimetrischen Wirkungsgrade (0,04 %) ergab, daß das Diazochromogen durch Pikrolonsäure anscheinend viel leichter gefällt wird als das reine Histidin.

γ) Fällung mit Mercurisulfat nach Kossel und Patten[1]). Der Hauptanteil der aus der Silberbarytlösung erhaltenen Fraktion wurde nunmehr jenem Fällungsverfahren unterworfen, dessen sich Kossel mit besonderem Vorteile zur Abtrennung des Histidins bedient hatte: die Flüssigkeit wurde mit so viel konzentrierter Schwefelsäure versetzt, daß der Prozentgehalt an dieser $2^1/_2$ % betrug. Nunmehr wurde ein Überschuß einer Mercurisulfatlösung hinzugefügt, die durch Auflösen von 75 g Quecksilberoxyd in 500 ccm 15 volumprozentiger H_2SO_4 in der Wärme bereitet worden war. Der voluminöse, sich gut absetzende Niederschlag wurde abgenutscht, mit Wasser gewaschen, vom Filter genommen, mit Wasser verrieben, wiederum abgenutscht und schwefelsäurefrei gewaschen. Sodann wurde der Niederschlag in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Es resultierte eine rotgelbe Lösung, die eine schöne Diazoreaktion gab.

δ) Silberfällung. Die Flüssigkeit wurde nunmehr so lange mit

---

[1]) Kossel und Patten, Zeitschr. f. physiol. Chem. **38**, 40, 1903.

10 %iger Silbernitratlösung versetzt, bis eine Tüpfelprobe gegen Barytwasser auf dem Uhrglase einen Silberüberschuß anzeigte. Es fiel ein dunkelbraun gefärbter, ziemlich voluminöser Niederschlag aus, der jedoch (wie sich nach Zerlegung desselben mit Salzsäure herausstellte) nur Spuren des Diazochromogens enthielt. Dasselbe war weitaus seiner Hauptmenge nach im Filtrate enthalten. Dieses wurde nun sehr vorsichtig, unter Vermeidung eines Überschusses, so lange tropfenweise mit Ammoniak versetzt, als der voluminöse hellbräunlichgelb gefärbte, sich gut absetzende Niederschlag noch eine Zunahme erkennen ließ. Der Niederschlag wurde nunmehr abfiltriert, gewaschen, durch Verreiben mit Salzsäure zerlegt und das Chlorsilber abfiltriert. Es resultierte eine gelblich gefärbte Flüssigkeit.

Die colorimetrische Auswertung ergab, daß von dem darin enthaltenen Stickstoffe mehr als die Hälfte (59 %) auf „Histidin-N" entfiel.

Durch die Aufeinanderfolge der Fraktionierungsoperationen war sonach eine schrittweise Anreicherung der Fraktionen an Diazochromogen erzielt worden. Während die ursprüngliche „Barytfraktion" nur $6^1/_2$ % „Histidin N" enthalten hatte, war der entsprechende Diazowert nach der Quecksilberfällung auf 27 %, nach der Silberbarytfällung auf 44 %, nach der Fällung mit ammoniakalischem Silber auf 59 % angestiegen.

Die zuletzt aus der Silberfällung erhaltene Fraktion wurde wiederholt mit konzentrierter Salzsäure eingedunstet; doch gelang es auch nach Impfung mit Histidinmonochloridkryställchen und nach längerem Stehen in der Kälte durchaus nicht, eine Krystallisation zu erzielen.

ε) Pikrolonsäurefällung. Schließlich wurde mit wenig Wasser aufgenommen und die Lösung tropfenweise mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung versetzt. Der voluminöse, amorphe gelbe Niederschlag wurde abfiltriert, gewaschen, in Alkohol gelöst, ein spärlicher harziger Rückstand abfiltriert, das Filtrat mit dem gleichen Volumen Wassers versetzt (wobei keine Trübung erfolgte) und der Alkohol nunmehr bei niederer Temperatur eingedunstet. Das Pikrolonat fiel nunmehr in Körnern aus, die jedoch bei mikroskopischer Untersuchung keine deutliche Krystallstruktur erkennen ließen.

Ich glaube auf Grund dieses Verhaltens behaupten zu dürfen, daß das vorliegende Diazochromogen nicht mit dem Histidin als solchem identisch sei, da aller Wahrscheinlichkeit nach anzunehmen ist, daß unter den gegebenen Bedingungen eine Krystallisation sowohl von Histidinmonochlorid als auch von Histidinpikrolonat erzielt worden wäre.

3. Versuch.

Direkte Abtrennung der Oxyproteinsäurefraktion durch Mercuriacetat; weitere Fraktionierung durch Phosphorwolframsäure und Silberlösung.

400 ccm der „Barytfraktion A" wurden mit einem Überschusse gesättigter Mercuriacetatlösung unter Zusatz von Na_2CO_3 ausgefällt, der (massenhaft $BaCO_3$ enthaltende) Niederschlag wurde abgenutscht, ausgewaschen, mit Salzsäure in Lösung gebracht, diese durch Schwefelsäure von Ba befreit, das dunkelgefärbte Filtrat mit Natronlauge neutralisiert und mit Mercuriacetat unter Alkalizusatz und strenger Einhaltung neutraler Reaktion neuerlich ausgefällt. Nach Zerlegung des gut ausgewaschenen Niederschlages mit H_2S resultierte eine Fraktion, die den Hauptanteil des Diazochromogens enthielt, und zwar entfielen hier drei Viertel ihres Gesamt-N (76 %) auf colorimetrisch ermittelten „Histidin-N".

Es mag überraschend scheinen, daß es uns auch ohne vorausgegangene Säurehydrolyse gelungen ist, das Diazochromogen von der Hauptmenge anderer, die Oxyproteinsäurefraktion zusammensetzender stickstoffhaltiger Substanzen abzutrennen. Wir müssen aber beachten, daß beim Sojafermentverfahren der Abtrennung der Oxyproteinsäurefraktion die andauernde Einwirkung von Barytwasser in der Wärme — also eine Alkalihydrolyse — tatsächlich bereits vorangegangen war.

Die Hauptmenge unserer durch Mercuriacetatfällung gewonnenen Fraktion wurde nunmehr mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der ausgewaschene Niederschlag in Wasser suspendiert, mit feingepulvertem Ätzbaryt bei Zimmertemperatur zerlegt, filtriert und das Filtrat mit Kohlensäure vom Barytüberschuß befreit.

Die Untersuchung der so erhaltenen gelb gefärbten Flüssigkeit in bezug auf Diazowert und N-Gehalt ergab wiederum, daß drei Viertel des Gesamt-N (74 %) auf „Histidin-N" entfielen. Diese Relation hatte also durch die weitere Fraktionierung mit Phosphorwolframsäure keine Verschiebung erfahren.

Der Rest der Fraktion wurde nunmehr, in der Hoffnung, vielleicht eine Abscheidung des gut krystallisierenden Histidinmonochlorids zu erzielen, wiederholt mit konzentrierter Salzsäure abgedampft; es wurde aber nur eine spärliche Krystallisation von Bariumchlorid erzielt. Die Salzsäure wurde nunmehr mit einem Überschusse von Silbernitrat beseitigt und das klare, hellweingelbe Filtrat durch vorsichtigen Zusatz von Ammoniak (unter sorgfältiger Vermeidung eines Überschusses, in dem derselbe sehr leicht löslich ist) ausgefällt. Es fiel ein voluminöser, hellgelber Niederschlag aus. Derselbe wurde gewaschen, bis das Waschwasser frei von Silber war, sodann mit Salzsäure zerlegt, die vom ausgeschiedenen Chlorsilber befreite Flüssigkeit ließ weder bei wiederholtem Eindampfen mit konzentrierter Salzsäure, noch bei lang-

dauerndem Verweilen im Vakuum über Schwefelsäure irgendeinen Ansatz deutlicher Krystallisation erkennen.

Dieser Versuch macht es wiederum in hohem Grade unwahrscheinlich, daß das Diazochromogen in diesem Falle mit Histidin als solchem identisch war. Denn es ist immerhin anzunehmen, daß es andernfalls gelungen wäre, unter den mitgeteilten günstigen Versuchsbedingungen das unschwer krystallisierende Histidinmonochlorid zur Abscheidung zu bringen.

4. Versuch.

Salzsäurehydrolyse; Fraktionierung durch Sublimat-, Silber- und Pikrolonsäurefällung.

400 ccm meiner Ausgangslösung („Barytfraktion A") wurden mittels eines geringen Überschusses von konzentrierter Schwefelsäure von Barium befreit. Der massenhafte $BaSO_4$-Niederschlag wurde abfiltriert, ausgewaschen, das schwarzbraune Filtrat mit Natronlauge neutralisiert und zum dünnen Sirup eingedampft.

Derselbe wurde nunmehr der Salzsäurehydrolyse unterworfen. Ich meinte, eine solche nicht unversucht lassen zu sollen, da manche Experimentatoren beim Studium der Eiweißhydrolyse einer solchen gegenüber der Schwefelsäurehydrolyse gewisse Vorzüge zugeschrieben haben.

Der Sirup wurde also in $^1/_4$ l konzentrierter reiner Salzsäure aufgenommen, ein massenhafter anorganischer Salzniederschlag abfiltriert und das Filtrat im Rundkolben mit aufgesetztem Steigrohre 6 Stunden lang in lebhaftem Sieden erhalten. Sodann wurde die Salzsäure im Vakuum bei etwa 75° abdestilliert und der Rückstand in heißem Wasser aufgenommen.

Dabei blieb ein schwarzer körniger Niederschlag ungelöst zurück, während die Lösung bräunlichrot erschien. Der Niederschlag wurde durch zweimaliges Lösen in Ammoniak und Fällen mit Salzsäure gereinigt und schließlich wieder in Ammoniak gelöst. In dieser Farbstoffreaktion fand sich weitaus die Hauptmenge jener Harnfarbstoffe, die unserer „Barytfraktion" ihre schwarzbraune Färbung erteilt hatten. Dagegen enthielt sie nur Spuren des Diazochromogens. Es war also in dieser Weise im wesentlichen gelungen, die Harnfarbstoffe vom Diazochromogen abzutrennen.

a) Sublimatfällung. Die das Diazochromogen enthaltende Hauptfraktion wurde nunmehr mit Natronlauge genau neutralisiert, ein spärlicher Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit konzentrierter wäßriger Sublimatlösung unter Zusatz von Na_2CO_3 10 % vollständig ausgefällt. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen, in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und der Quecksilbersulfidniederschlag schließlich mit Wasser ausgekocht.

β) Fällung mit ammoniakalischem Silber. Das sauere rotgelbe Filtrat wurde mit einem Überschuß von Silbernitrat gefällt, das Filtrat sehr vorsichtig unter Vermeidung eines Überschusses mit Ammoniak gefällt und der abgesaugte, sehr gründlich mit Wasser gewaschene Niederschlag mit Salzsäure zerlegt.

Die colorimetrische Auswertung ergab, daß in der so erhaltenen Fraktion etwa 50 % des Gesamt-N auf Histidin-N entfielen.

γ) Pikrolonsäurefällung. Die Hauptmenge der Fraktion wurde auf 20 ccm eingeengt und die rotbraune Flüssigkeit mit alkoholischer Pikrolonsäurelösung ausgefällt, der amorphe, voluminöse Niederschlag ausgewaschen, in konzentrierter Salzsäure in Lösung gebracht und die Lösung nunmehr durch Ausschütteln mit Äther im Scheidetrichter von Pikrolonsäure befreit. Das Ausschütteln wurde so lange mit neuen Portionen Äthers (6 mal) fortgesetzt, bis derselbe keine Pikrolonsäure mehr aufnahm. Es wurde dies in der Weise festgestellt, daß eine Probe des Äthers an Natronlauge keinen Farbstoff mehr abgab. (Der pikrolonsäurehaltige Äther erzeugt in Natronlauge beim Schütteln eine rotbraune Färbung, was dem Charakter der Pikrolonsäure als Nitrokörper entspricht.)

In der völlig von Pikrolonsäure befreiten salzsauren Flüssigkeit ließ sich colorimetrisch wiederum etwa 50 % des Gesamt-N als „Histidin-N" feststellen. Diese Relation hatte sonach durch die Pikrolonsäure-Fraktionierung keine weitere Verschiebung erfahren.

Ich benutzte schließlich die Fraktion, um den Resistenzgrad des Diazochromogens gegenüber Permanganat festzustellen. Es ergab sich, daß das Chromogen von diesem in saurer Lösung in der Wärme energisch angegriffen und zerstört wird.

Die mitgeteilten Fraktionierungsversuche haben uns so weit Aufklärung gebracht, daß wir die Ergebnisse derselben etwa in folgender Weise zusammenfassen können:

Die in der Oxyproteinsäurefraktion des menschlichen Harnes enthaltenen, mit Diazobenzolsulfosäure unter Bildung roter Farbstoffe reagierenden Chromogene sind thermostabile, auch gegenüber der Hydrolyse mit starken Mineralsäuren durchaus resistente Substanzen. Vorläufig kann nichts darüber ausgesagt werden, ob es sich um ein einziges Chromogen oder um mehrere Chromogene handelt, die einander in ihrem qualitativen Verhalten nahestehen. In diesem Sinne kann das nach vollzogener Hydrolyse der Oxyproteinsäurefraktion des normalen Harnes in Erscheinung tretende Diazochromogen (oder aber der Typus der Diazochromogene, falls deren mehrere existieren sollten) in folgender Weise charakterisiert werden:

Das Diazochromogen gibt keine Millonsche Reaktion,

ist also weder mit dem Tyrosin noch aber mit einem anderen Oxyphenylderivate identisch. Es ist mit Phosphorwolframsäure fällbar und wird von Quecksilberchlorid und -acetat bei schwach alkalischer Reaktion, von Mercurisulfat und -nitrat jedoch auch bei saurer Reaktion gefällt. Von Silbernitrat unter Zusatz von Barytwasser oder Ammoniak wird das Diazochromogen gefällt, die Fällung ist im Überschusse von Ammoniak sehr leicht löslich. Das Diazochromogen zeigt in seinem Verhalten gegenüber Fällungsmitteln weitgehendste Übereinstimmung mit dem Histidin. Auch von Pikrolonsäure wird es (allerdings anscheinend leichter als das Histidin) niedergeschlagen. Durch Lösen des Pikrolonates in konzentrierter Salzsäure und Ausschütteln mit Äther kann das Diazochromogen aus dem Pikrolonate wieder gewonnen werden.

Das freie Chromogen ist löslich in Alkohol, unlöslich in Äther und wird aus der alkoholischen Lösung durch Aceton nur schwer abgeschieden.

Es ist gelungen, das Diazochromogen von den Harnfarbstoffen, die der hydrolysierten Oxyproteinsäurefraktion eine sehr intensive schwarzbraune Färbung erteilen, abzutrennen und zu zeigen, daß die Dunkelfärbung des hydrolysierten normalen Harnes und die Diazoreaktion nichts miteinander zu tun haben.

Das Chromogen gibt die Paulysche Diazoreaktion mit schön bläulichroter Färbung; dieselbe schlägt auf Säurezusatz in ein thermostabiles Gelbrot um. Beim Kochen der salzsauren Lösung mit Zinkstaub tritt weingelbe, bei weiterem Zusatze von Ammoniak goldgelbe Färbung auf.

Da es nicht gelungen ist, die Krystallisation von Histidinmonochlorid oder von Histidinpikrolonat unter Verhältnissen zu erzielen, wo eine solche mit Bestimmtheit zu erwarten gewesen wäre, wenn es sich um Histidin als solches gehandelt hätte, erscheint es höchst unwahrscheinlich, daß Histidin als solches bei der Hydrolyse in Freiheit gesetzt wird. Auch ist es beim Fraktionierungsverfahren niemals gelungen, eine Fraktion so weit mit dem Chromogen anzureichern, daß ihr N-Gehalt sich mit dem colorimetrisch als Histidin berechneten N wirklich

gedeckt hätte; vielmehr entfiel nur die Hälfte bis höchstens drei Viertel des Gesamt-N auf Histidin-N.

Die weitgehende Übereinstimmung im chemischen Verhalten spricht aber immerhin mit großer Wahrscheinlichkeit dafür, daß das Diazochromogen, wenn auch nicht mit dem Histidin identisch, so doch ein Imidazolderivat und als solches dem Histidin nahe verwandt sei. Vermutlich dürfte es sich um ein oder mehrere aus dem Histidin im intermediären Stoffwechsel entstandene Umwandlungs- oder Kondensationsprodukte handeln.

III.

Abhängigkeit des Diazowertes vom Eiweißzerfall im Organismus.

Ich bin nunmehr daran gegangen, mir ein Urteil darüber zu verschaffen, inwieweit der „Diazowert" des menschlichen Harnes mit dem Eiweißzerfall zusammenhängt.

Aus einer Versuchsreihe, die vor einigen Jahren M. Maßlow[1]) in diesem Laboratorium an Hunden bei verschiedener Ernährung ausgeführt hatte, geht hervor, daß die Ausscheidung des „Diazochromogens" im Hundeharne sowohl von der Menge der im Nahrungseiweiß enthaltenen Histidinkomplexe als auch von der Menge des im Carnosin (einer komplexen, aus Histidin und Alanin zusammengesetzten Verbindung) enthaltenen Histidins unabhängig ist; dagegen ergab sich ein enger Zusammenhang zwischen der Ausscheidung des Diazochromogens und dem Gesamteiweißumsatze im Organismus.

Ich berechnete nun aus Maßlows Versuchen die „Diazoquotienten", d. h. jene Zahlen, die angeben, wieviel Prozente des Gesamtstickstoffes auf „Histidin-N" entfallen. Dabei wird das Diazochromogen derart in Rechnung gestellt, als ob eine Menge Histidinmonochlorid von gleichem colorimetrischen Wirkungsgrade vorhanden wäre, was ja, dem oben Gesagten zufolge, tatsächlich nicht der Fall ist. Vielmehr handelt es sich anscheinend im wesentlichen um ein vom Histidin abgeleitetes Kondensations- oder Umwandlungsprodukt.

Aus Maßlows beiden Versuchsserien ergeben sich nun folgende „Diazoquotienten":

---

[1]) l. c.

Art der Ernährung (Tagesnahrung)	Hund I (12 kg)	Hund II (14 kg)
400 g rohes Pferdefleisch + 200 g Kartoffeln	0,46	0,34
400 g Blutwurst + 200 g Kartoffeln .	0,24	0,35
400 g ausgekochtes Pferdefleisch + 200 g Kartoffeln	0,32	0,36
Hungerperiode	0,43	0,63
400 g Kartoffeln	0,41	0,94
800 g Pferdefleisch	0,36	0,33
Beginnende Phosphorvergiftung . . .	0,45	0,63
Fortschreitende Phosphorvergiftung .	0,54	0,56

Was nun die Ausscheidung des Diazochromogens im Menschenharne betrifft, galt es zunächst, den „Diazowert" und den „Diazoquotienten" des normalen Menschenharnes zu ermitteln. Eine Reihe diesbezüglicher Zahlenwerte sind der Tabelle von M. Weiß in seiner letzten Publikation[1]) zu entnehmen. Herr Dr. Weiß war ferner so liebenswürdig, mir eine Anzahl noch nicht publizierter Analysenwerte, auf normale Harne aus der Friedenszeit bezüglich, zur Verfügung zu stellen, was mir um so willkommener war, als ja die Harne auch gesunder Menschen unter den gegenwärtigen ganz abnormen Ernährungsverhältnissen unmöglich als „normale" Harne gelten können. Ich hatte übrigens auch noch einen Ballon mit 100 l normalen menschlichen Mischharnes aus dem Jahre 1914 unter Toluol konserviert. Derselbe erwies sich nun in mäßigem Grade vergoren, hatte seinen Gesamt-N-Gehalt im Laufe von mehr als 4 Jahren kaum merklich verändert[2]) und erwies sich für meine Zwecke noch brauchbar.

Eine weitere Reihe von Beobachtungen an Tuberkulösen rühren von M. Weiß her. Dieselben beziehen sich einerseits auf beginnende Tuberkulose in gutem Ernährungszustande ohne Kachexie, anderseits auf Fälle von vorgeschrittener Tuberkulose mit positiver Ehrlichscher Diazoreaktion.

Wertvolles Material lieferte mir eine von Fräulein Klara Kohn[3]) in diesem Laboratorium kürzlich ausgeführte Versuchs-

[1]) M. Weiß, diese Zeitschr. 81, 345, 1917.
[2]) Die Kjeldahlbestimmungen ergaben in 100 ccm:
im Jahre 1914, im Mittel 1,0899 g N,
„ „ 1919, „ „ 1,0892 g N.
[3]) Klara Kohn, l. c.

reihe über chronische Unterernährung (unter Ermittlung des Caloriengehaltes der aufgenommenen Nahrung) auf Grund von Beobachtungen über die Ernährungsverhältnisse in Wien während des letzten Kriegsjahres.

Schließlich habe ich eine Reihe von Harnen untersucht, die von schwer kachektischen Individuen herrührten und für deren Beistellung ich den Kliniken bzw. Abteilungen der Herren Chvostek, Ortner, Wenkebach, Knöpfelmacher und Mannaberg zu Danke verpflichtet bin. Es handelt sich u. a. um mehrere Fälle von schwerer Phthise im vorgeschrittenen Stadium, mehrere Neoplasmen, einen Fall von Sepsis und eine perniziöse Anämie.

Was nun die Technik der Ermittlung des Diazowertes eines Harnes angeht, gestaltet sich die Vorbereitung des Harnes für die colorimetrische Bestimmung nach Weiß und Ssobolew sehr einfach. Nach M. Weiß[1]) empfiehlt es sich am meisten, den Harn mit Barytwasser auszufällen, den Barytüberschuß mit Schwefelsäure zu beseitigen, mit 10⁰/₀iger Sodalösung zu neutralisieren und einzuengen. Ich ging stets so vor, daß ich 100 ccm Harn in Arbeit nahm und das letzte Filtrat schließlich auf 50 ccm im Meßkölbchen auffüllte.

Die colorimetrische Bestimmung wurde unter genauer Einhaltung der Vorschriften von M. Weiß und N. Ssobolew[2]) durchgeführt. Dabei ist zu bemerken, daß auf die Anwesenheit von hemmenden Substanzen, die den Eintritt der Farbenreaktion abschwächen oder auch ganz hindern können, stets sorgfältig Rücksicht zu nehmen ist. Es kann geschehen, daß etwa ein Harn bei 3facher Verdünnung nur eine sehr schwache, bei 10facher Verdünnung aber eine sehr starke Reaktion ergibt. Man muß sich stets durch Serienversuche wirklich die Überzeugung verschaffen, daß weder eine weitere Verdünnung, noch aber ein Mehrzusatz von Diazoreagens eine Zunahme der Färbung bewirkt, und es ist tatsächlich unerläßlich, durch Variation der beiden Variabeln (Konzentration der Untersuchungsflüssigkeit und Menge des Diazoreagens) das Optimum der Reaktion genau zu ermitteln, wenn man groben Täuschungen ent-

---

[1]) M. Weiß, diese Zeitschr. 81, 348, 1917.
[2]) l. c.

gehen will. Ich ging immer derart vor, daß ich in ein 20 ccm fassendes Meßkölbchen immer 10 ccm der jeweilig verdünnten Fraktion, ferner 1 bis 7 ccm Diazoreagens, sodann die erforderliche Menge Natriumcarbonat hinzufügte und schließlich mit Wasser bis zur Marke 20 auffüllte.

Was den Zusatz von Soda betrifft, erwies es sich insbesondere dort, wo viel Diazoreagens zur Anwendung gelangt war, am praktischsten, dasselbe in Form von einer oder mehrerer Messerspitzen wasserfreien Natriumcarbonates zuzusetzen, da man mit 10%iger Sodalösung den Punkt des Farbenumschlages in Rot oft nicht erreichen kann, ohne das gewünschte Gesamtvolumen von 20 ccm zu überschreiten. Irgendeinen nachteiligen Einfluß eines mäßigen Sodaüberschusses auf den Eintritt der Farbenreaktion habe ich niemals wahrgenommen.

Ich möchte es nicht unterlassen, noch auf einen wichtigen Punkt hinzuweisen, nämlich die Herstellung einer verläßlichen Histidinstandardlösung. Die Standardlösungen sind zwar, wie Weiß und Ssobolew sagen, nach Zusatz einiger Kubikzentimeter Chloroform lange Zeit hindurch haltbar. Unbegrenzt ist aber diese Haltbarkeit keineswegs und ich konnte mich davon überzeugen, daß eine Histidinlösung im Laufe einiger Monate eine sehr erhebliche Abnahme ihres colorimetrischen Diazowertes erleiden kann.

Es ist ja sicherlich nicht ganz leicht, sich ein völlig einwandfreies Präparat des leichtlöslichen Histidinmonochlorids zu verschaffen. Dagegen ist es nicht schwer, sich durch Verarbeitung frischen Fleisches etwa nach dem von mir gemeinsam mit Th. Hryntschak beschriebenen Vorgange[1]) die in Wasser schwerlösliche, schön krystallisierende Kupferverbindung des Carnosins herzustellen. Man kann dieselbe überdies bequem und ohne große Verluste aus Ammoniak bei niederer Temperatur umkrystallisieren und etwa durch eine Kupfer- oder Stickstoffbestimmung die Reinheit des Präparates sicherstellen.

Da ich noch von einer früheren Untersuchung her im Besitze einer kleinen Menge einwandfreien Carnosinkupfers war, benutzte ich dasselbe, um den Standard meiner Histidinlösungen zu überprüfen bzw. richtigzustellen. Ich ging dabei so vor, daß ich eine genau abgewogene Menge des bei Zimmertemperatur im Vakuum über Schwefelsäure scharf getrockneten Carnosinkupfers in Wasser suspendiert mit Schwefelwasserstoff zerlegte, den letzteren durch einen Luftstrom vertrieb und sodann das kolloidal suspendierte Kupfersulfid durch Zusatz einiger Tropfen Salzsäure zur Abscheidung brachte. Der Niederschlag wurde nunmehr abfiltriert, erst mit kaltem, sodann aber mit kochendem Wasser genau ausgewaschen und das Filtrat schließlich auf ein berechnetes Volumen

---

[1]) O. v. Fürth und Th. Hryntschak, diese Zeitschr. 64, 190 ff., 1914.

gebracht; und zwar wurde die Bereitung derart durchgeführt, daß die Lösung in bezug auf ihren Gehalt an gebundenem Histidin einer 0,01 %igen Lösung von Histidinmonochlorid[1] ($C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$) äquivalent erschien. Dabei ist zu beachten, daß dem Carnosinkupfer die Zusammensetzung $C_9H_{14}N_4O_3 \cdot CuO$ zukommt[2]) und daß ein Molekül Carnosin ein Molekül Histidin neben einem Molekül Alanin enthält. Daß das im Carnosin gebundene Histidin freiem Histidin gegenüber colorimetrisch gleichwertig ist, geht aus früheren Untersuchungen[3]) hervor.

Die Resultate meiner Versuche finden sich in beifolgender Tabelle zusammengestellt.

Wir finden in derselben außer der Tagesmenge des Harnes und der in derselben enthaltenen Menge des Gesamtstickstoffes, die als Histidinmonochlorid ausgedrückten „Diazowerte", und zwar sowohl für den Tagesharn als auch für 100 ccm Harn. Eine weitere Kolonne enthält die „Diazokoeffizienten", d. h. jene Zahlen, die angeben, wie viele Prozente des Gesamt-N auf den Stickstoff des Diazochromogens entfallen, wobei wir wiederum dieses letztere, um einen relativen Vergleichswert zu erhalten, vorläufig als Histidinmonochlorid in Rechnung bringen, wenngleich wir allen Grund haben, anzunehmen, daß es sich nicht um solches, vielmehr um ein sich vom Histidin herleitendes Imidazolderivat handeln dürfte.

Was ergeben nun unsere Versuche?

Wir ersehen zunächst, daß der normale Mensch das Diazochromogen in sehr konstanten Proportionen ausscheidet: etwa 0,03 bis 0,07 (Mittel 0,044) in 100 ccm Harn und 0,3 bis 0,6 (Mittel 0,41) im Tagesharne. Die Relation zwischen Diazo-N und Gesamt-N erweist sich als recht konstant; der „Diazoquotient" schwankte zwischen 0,38 bis 0,78, also innerhalb ziemlich enger Grenzen um einen Mittelwert, der mit 0,6 ermittelt wurde. Das heißt also: vom Gesamt-N entfallen im Mittel 0,6 % auf den (als Histidinmonochlorid in Rechnung gebrachten) N-Gehalt des Diazochromogens.

Liegt nun aber nicht ein Widerspruch darin, wenn Maßlow die Ausscheidung des Diazochromogens ganz unabhängig von der Menge der im Nahrungseiweiß enthaltenen Histidinkomplexe gefunden hat, wir aber eine ziemlich

---

[1]) Vgl. Abderhaldens Biochem. Handlexikon 4, 719, 1911.

[2]) W. Gulewitsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 571, 1900.

[3]) O. v. Fürth und Th. Hryntschak, l. c., S. 178.

Tabelle.

	Beobachter	Versuchsperson bzw. Diagnose	Tagesmenge des Harnes ccm	Gesamt-N im Tagesharn g	Diazowert im Tagesharn, ausgedrückt als Histidinmonochlorid	Diazowert in 100 ccm Harn, ausgedrückt als Histidinmonochlorid	Vom Gesamt-N entfallen auf Histidin-N %	Caloriengehalt der Tagesnahrung
Normaler Harn	Dr. M. Weiß	Eigener Mischharn	900	15,38	0,601	0,067	0,78	—
	"	do.	1000	16,10	0,440	0,044	0,64	—
	"	do.	900	16,38	0,392	0,044	0,48	—
	"	do.	810	13,58	0,500	0,062	0,73	—
	"	do., normale Diät	790	15,96	0,308	0,039	0,38	—
	"	do., fleischlose Diät	900	11,00	0,301	0,033	0,54	—
	Dr. M. Weiß u. N. Ssobolew	**Mischharn a. d. J. 1914**	**1000**	**12,33**	**0,400**	**0,040**	**0,64**	—
	"	do.	1000	12,00	0,350	0,035	0,58	—
	"	do.	1050	10,95	0,380	0,038	0,68	—
	Fürth	do. (100 Liter)	(1500)	(16,34)	0,465	0,031	0,55	—
	Mittelwerte		—	**14,00**	**0,414**	**0,044**	**0,60**	—
Beginnende Tuberkulose ohne Kachexie	Dr. M. Weiß	Tuberkulose im I. oder II. Stadium ohne Diazoreaktion nach Ehrlich	1700	7,35	0,187	0,011	0,50	—
	"	do.	1700	6,58	0,246	0,014	0,74	—
	"	do.	800	10,99	0,360	0,045	0,65	—
	"	do.	1200	16,80	0,486	0,040	0,58	—
	"	do.	1000	14,29	0,550	0,055	0,76	—
	"	do.	1880	9,94	0,360	0,020	0,72	—
	"	do.	1000	14,84	0,500	0,056	0,61	—
	"	do.	900	14,00	0,581	0,058	0,73	—
	Mittelwerte		—	**11,86**	**0,416**	**0,038**	**0,63**	—
Chronische eiweißarme Unterernährung	Fürth	K. Schmidt	—	—	—	0,017	0,91	—
	"	Frau Schmidt A	1460	6,96	0,204	0,014	0,79	1127
	"	" " B	950	3,61	0,133	0,014	0,74	393
	"	Franz Schneck A	1600	8,53	0,512	0,022	1,16	1089
	"	" " B	1400	5,08	0,448	0,032	1,08	1009
	"	Frau Kolar A	1050	3,94	0,126	0,012	0,64	}1191
	"	" " B	800	2,76	0,104	0,013	0,75	
	"	Frau Schneck	1090	6,94	0,143	0,013	0,64	1089
	"	Prof. Franz Süß	1600	6,77	0,416	0,026	0,91	2556
	"	Berta Frömmel	1900	7,72	0,163	0,0086	0,41	1755
	"	Frl. Cerletti	1600	8,80	0,292	0,022	0,99	2346
	"	Marie Schiroky	2100	10,29	0,231	0,011	0,45	1443
	"	Anna Berger	1900	7,42	0,380	0,020	1,27	1296
	Mittelwerte		—	**6,82**	**0,226**	**0,018**	**0,83**	**1390**
Kachexien	Fürth	Malaria tertiana sine Kachexia	—	—	—	0,012	0,51	—
	Dr. M. Weiß	Vorgeschrittene Tuberkulose mit positiver Ehrlichscher Diazoreaktion	800	11,77	0,518	0,065	0,88	—
	"	do.	1000	11,49	0,430	0,043	0,74	—

Tabelle (Fortsetzung).

Kachexien

Beobachter	Versuchsperson bzw. Diagnose	Tagesmenge des Harnes ccm	Gesamt-N im Tagesharn g	Diazowert im Tagesharn, ausgedrückt als Histidinmonochlorid	Diazowert in 100 ccm Harn, ausgedrückt als Histidinmonochlorid	Vom Gesamt-N entfallen auf Histidin-N %	Caloriengehalt der Tagesnahrung
Dr. M. Weiß	Vorgeschrittene Tuberkulose mit positiver Ehrlichscher Diazoreaktion	1100	8,68	0,450	0,045	1,03	—
"	do.	800	13,45	0,480	0,060	0,71	—
"	do.	1000	13,45	0,584	0,058	0,86	—
"	do.	1000	14,29	0,576	0,058	0,82	—
Fürth	Rectumcarcinom (Kl. Ortner)	—	—	—	0,016	0,86	—
"	Sarkom mit Metastasen im Rückenmarke (Kl. Ortner)	—	—	—	0,020	0,63	—
"	Tbc. pulm. et peritonei (Kl. Chvostek)	2000	7,62	0,366	0,018	0,94	—
"	Anaemia gravis (Kl. Wenkebach)	—	—	—	0,023	0,78	—
"	Schwere Tbc.-Kachexia 8 jähriges Kind (Abt. Knöpfelmacher)	600	0,96	0,03	0,005	0,63	—
"	Schwere Tbc.-Kachexie 8 jähriges Kind (Abt. Knöpfelmacher)	550	1,892	0,11	0,020	1,33	—
"	Sepsis (41° Fieber) 9 jähriges Kind (Abt. Knöpfelmacher)	—	—	—	0,025	0,85	—
"	Herminc Redak. cavernöse Phthise, hoch fiebernd (Kl. Ortner)	300	5,28	0,255	0,085	0,96	—
"	Leopoldine Hausbeck, Psoas-Absceß, hoch fiebernd (Kl. Ortner)	1400	6,61	0,245	0,0175	0,74	—
"	J. Schneeweiß, Carcinom. oesophag. Gastrostomie, Milchnahrung (Abt. Mannaberg)	—	—	—	0,048	0,38	—
"	Frl. Sofka, Cavernöse Phthise, andauernd hoch fiebernd (Kl. Ortner)	900	7,80	0,270	0,030	0,69	—
Mittelwerte		—	—	—	0,047	0,83	—

strenge Proportionalität zwischen Gesamteiweißumsatz und Diazochromogen bemerken konnten? Ich glaube nicht, daß hier ein Widerspruch vorliegt. Die einfachste Deutung wäre wohl die, daß sich der Eiweißabbau eben in verschiedener Weise vollzieht, je nachdem es sich um Nahrungseiweiß oder Protoplasmaeiweiß handelt. Die Imidazolkomplexe der Nahrungsproteine kommen offenbar ebensowenig wie verfüttertes Histidin als Diazochromogen im Harn zum Vorschein. Sonst müßte ja ein mit Blutwurst gefütterter Hund (entsprechend dem Reichtum des Globins an Histidin) doch reichlich Diazochromogen ausscheiden, was nicht der Fall ist. Wohl aber scheint beim Zerfall von „lebendem Eiweiß" das Imidazol in irgendeiner Form aufzutreten, die den zerstörenden Kräften des intermediären Stoffwechsels Widerstand leistet und schließlich in den Harn übergeht. Wenn nun trotzdem eine gewisse Proportionalität zwischen Gesamteiweißumsatz und Diazochromogenausscheidung besteht, das letztere aber dennoch nicht aus den Nahrungsproteinen entstammt, so wäre, meine ich, die logische Schlußfolgerung die: Das Diazochromogen scheint endogenen Ursprungs zu sein; eine vermehrte Verarbeitung von Nahrungseiweiß stellt an das Protoplasma der Körperzellen erhöhte Anforderungen (wie sich ja schließlich jede Maschine um so stärker abnützt, je stärker sie arbeitet) und die Folge ist eine vermehrte Ausscheidung von Diazochromogen.

Fast genau dieselben Werte wie bei Normalen fanden sich bei Tuberkulösen in den ersten Stadien ihrer Erkrankung, die sich in gutem Ernährungszustande befanden und deren Harn keine Ehrlichsche Diazoreaktion gaben: mittlerer Diazowert 0,038 in 100 ccm Harn, 0,416 im Tagesharn, mittlerer Diazoquotient 0,63.

Betrachten wir nunmehr die Versuchsserie über chronische Unterernährung, so ergibt sich folgendes: Hier haben wir es mit Individuen zu tun, die eine Nahrung von abnorm niedrigem Energie- und Eiweißgehalt zu sich genommen hatten. Die Mehrzahl derselben bleibt mit einer täglichen Calorienaufnahme von weniger als 1400 unter der Hälfte jenes Calorienbedarfes, der für einen erwachsenen Menschen als normal gelten kann. Dementsprechend hält sich auch die N-Ausscheidung

bei diesen Personen auf einem sehr niedrigen Niveau (mittlere Tagesausscheidung 6,82 g N gegenüber 14,0 g N bei den untersuchten Normalharnen). Bei der Mehrzahl derselben war, wie die Analysen von Fräulein Kohn[1]) gezeigt haben, die N-Bilanz mehr oder minder stark negativ.

Was nun die Ausscheidung des Diazochromogens in diesen Fällen betrifft, bleibt der Diazowert, man möge denselben auf 100 ccm Harn oder aber auf den Tagesharn berechnen, stark hinter der Norm zurück (Mittel: 0,226 im Tagesharn, 0,018 in 100 ccm). Es könnte dies nicht der Fall sein, wenn das Diazochromogen ausschließlich ein Maß der unabhängig von der Nahrungsaufnahme sich vollziehenden Zellabnützung wäre. Denn in diesem Falle wäre ja zu erwarten, daß infolge der unabhängig von der Nahrungsaufnahme fortschreitenden Abnützung des Körperprotoplasmas die absolute Tagesmenge ausgeschiedenen Diazochromogens der Norm gegenüber zum mindesten nicht vermindert sein dürfte. Im Gegenteil wäre darauf zu rechnen, daß die vermehrte Einschmelzung des Zellbestandes infolge der ungünstigen Ernährungsverhältnisse eine vermehrte Tagesausscheidung des Chromogens herbeiführen müßte. Tatsächlich ist dies aber ganz und gar nicht der Fall.

Wir werden daraus folgern müssen, daß die Produktion des Diazochromogens nicht nur mit der sich stetig und unabhängig von der Nahrungsaufnahme vollziehenden „Zellmauserung“, sondern auch mit der Inanspruchnahme des Zellprotoplasmas durch die Verdauungs- und Assimilationsarbeit irgendwie zusammenhängen dürfte.

Es könnte nun aber etwa auch so sein, daß die Menge ausgeschiedenen Diazochromogens ausschließlich von der Gesamtmenge umgesetzter Proteide abhängt und daß es tatsächlich ganz gleichgültig sei, ob es sich um Nahrungseiweiß oder um zerfallendes Eiweiß des eigenen Körpers handle. Wäre dies der Fall, so müßte der „Diazoquotient“ bei der chronischen Unterernährung weder wesentlich größer, noch wesentlich kleiner sein als in der Norm. Ein Blick auf unsere Tabelle belehrt uns aber darüber, daß auch dies nicht der Fall

---

[1]) l. c.

ist: vielmehr nimmt unter der Einwirkung der chronischen Unterernährung der Diazoquotient sehr merklich, in manchen Fällen sogar sehr erheblich (bis auf das Doppelte des Normalwertes) zu. Ich glaube, man wird also logischerweise folgern müssen, daß das körpereigene Eiweiß dem Nahrungseiweiß gegenüber in bezug auf die Genese des Diazochromogens immerhin eine Vorzugsstellung einnimmt.

Ganz ähnliche Verhältnisse ergeben sich nun bei Beobachtung von kachektischen Ernährungsstörungen verschiedener Art. Während z. B. ein Fall von Malaria, wo von einer Kachexie keine Rede sein konnte, auch im Fieberanfalle einen niederen Diazowert und einen normalen Diazoquotienten aufwies, ergab sich in der großen Mehrzahl dieser Fälle eine merkliche, zuweilen eine sehr beträchtliche Zunahme des Diazoquotienten. So wurden (gegenüber der Norm von 0,6) in mehreren Fällen vorgeschrittener Lungentuberkulose Diazowerte von 0,8 bis 1,0 beobachtet. In einem Falle schwerster kavernöser Phthise bei einem Kinde wurde sogar der Wert 1,33 wahrgenommen, was einer Verdoppelung des Normalwertes entspricht. Bei einem Falle von Sepsis fand sich ein Diazoquotient von 0,85 und bei einem Falle von Rectumkarzinom 0,86.

Sehr instruktiv ist eine scheinbare Ausnahme von der Regel: Es handelt sich um einen Fall von Carcinoma oesophagi, wo die Gefahr des Verhungerns des stark heruntergekommenen Patienten durch die Gastrostomie und die Einleitung einer ausreichenden Ernährung mit Milch abgewendet worden war. Trotz des kachektischen Zustandes des Patienten war der Diazoquotient in diesem Falle nicht nur nicht erhöht, vielmehr stark unter die Norm vermindert (auf 0,38). Ich glaube dies so erklären zu sollen, daß hier durch die Gastrostomie gewissermaßen eine Umkehrung des Stoffwechsels herbeigeführt worden war, insofern die halbverhungerten Gewebe mit größter Begierde sich mit Eiweiß vollsaugen konnten und der Zellaufbau wenigstens zeitweilig über den Zellabbau die Oberhand gewonnen hatte. Einen Anhaltspunkt dafür, daß dies tatsächlich der Fall war, bot die Untersuchung des (in diesem Fall abnorm niedrigen) calorischen Harnquotienten.

Darüber soll in einer weiteren Untersuchung näher berichtet und dort auch gezeigt werden, daß die calorische

Harnuntersuchung verbunden mit der Untersuchung der „Schlackenstoffe" uns wertvolle Aufschlüsse zu geben vermag. Als einer dieser Schlackenstoffe hat eben das Diazochromogen zu gelten.

Zusammenfassung.

1. Beim Studium der Diazoreaktion des Harnes muß die klinische Diazoreaktion pathologischer Harne nach Ehrlich von der auch dem normalen Harne eigentümlichen Diazoreaktion nach Penzoldt und Pauly (Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure und Natriumcarbonat) scharf unterschieden werden. Die erstere ist nach M. Weiß an das im normalen Harne nicht vorkommende Urochromogen gebunden.

2. Jene Substanz, welche die Diazoreaktion des normalen Harnes nach Penzoldt und Pauly verursacht, gehört zum mindesten ihrer Hauptmenge nach der Oxyproteinsäurefraktion an und hat weder mit dem Tyrosin noch aber mit anderen Oxyphenylderivaten irgend etwas zu tun. Dieselbe ist thermostabil, auch gegenüber der Hydrolyse mit starken Mineralsäuren durchaus resistent und ist von den Harnfarbstoffen abtrennbar.

3. Nach vollzogener Hydrolyse verhält sich das in Alkohol lösliche, in Äther unlösliche Chromogen gegenüber Fällungsmitteln ganz analog dem Histidin. Es ist fällbar durch Phosphorwolframsäure, durch Quecksilberchlorid und -acetat bei schwach alkalischer, durch Mercurisulfat auch bei saurer Reaktion. Es wird von Silbernitrat unter Zusatz von Barytwasser oder Ammoniak gefällt; die Fällung ist im Überschusse des letzteren sehr leicht löslich. Von Pikrolonsäure wird das Chromogen leichter niedergeschlagen, als dies beim Histidin der Fall ist; aus dem in konzentrierter Säure gelösten Pikrolonate kann das Chromogen durch Ausschütteln der Pikrolonsäure mit Äther wiedergewonnen werden.

4. Dieses Chromogen ist zwar allem Anscheine nach mit dem Histidin als solchem nicht identisch, demselben jedoch nahe verwandt, und zwar dürfte es sich um ein aus dem Histidin im intermediären Stoffwechsel durch Kondensationsvorgänge entstandenes Imidazolderivat handeln.

5. Die Schätzung der relativen Menge des Chromogens ist nach dem colorimetrischen Verfahren von M. Weiß und

N. Ssobolew (unter Umrechnung auf eine Histidinmenge von analoger colorimetrischer Wertigkeit) möglich. Zum Zwecke der Herstellung verläßlicher Standardlösungen empfiehlt es sich, von der schön krystallisierenden, in Wasser schwer löslichen Kupferverbindung des Carnosins auszugehen.

6. Der „Diazowert" des normalen Menschenharnes (umgerechnet auf Histidinmonochlorid) beträgt bei unseren Versuchen 0,03 bis 0,07 (Mittel 0,044) in 100 ccm Harn und 0,3 bis 0,6 im Tagesharn. Der „Diazoquotient", der angibt, wieviel Prozent vom Gesamt-N auf Histidin-N entfallen, beträgt 0,38 bis 0,78 (Mittel 0,6). Ganz ähnliche Werte ergaben Harne von Tuberkulösen in gutem Ernährungszustande und in den Anfangsstadien ihrer Erkrankung, sowie auch der Harn eines nicht kachektischen Malariakranken im Fieberanfalle.

7. Bei chronischer eiweißarmer Unterernährung wurde zwar entsprechend der stark verminderten Stickstofftagesausscheidung (Mittel 6,8 gegenüber 14,0 g N in der Norm) ein Absinken der absoluten Diazowerte gefunden, dagegen zeigte der Diazoquotient eine Tendenz zum Anstiege (Mittelwert 0,83 gegenüber 0,63 in der Norm), die in einzelnen Fällen, wobei es sich um Individuen mit hochgradig gestörtem Stickstoffgleichgewichte gehandelt hat, sehr ausgesprochen war (Diazoquotienten zwischen 0,9 bis 1,3).

8. Ein ähnlicher Anstieg der Diazoquotienten wurde bei einer Anzahl schwer kachektischer Individuen beobachtet (Fälle von vorgeschrittener Tuberkulose, malignen Neoplasmen, Sepsis, perniziöser Anämie: Diazoquotienten 0,8 bis 1,3).

9. Da die Ausscheidung des Diazochromogens von der Menge des im Nahrungseiweiß gebundenen oder im Fleischextrakte in Form von Carnosin enthaltenen Histidins ganz unabhängig ist (Maßlow), erscheint ein exogener Ursprung der im Diazochromogen enthaltenen Imidazolkomplexe unwahrscheinlich.

10. Vielmehr weist der Umstand, daß Einschmelzung des Körperprotoplasmas, sei es infolge Unterernährung, sei es infolge kachektischer Krankheitszustände, die Tendenz besitzt, den Diazoquotienten zu erhöhen, auf einen endogenen Ursprung des Diazochromogens hin. Die Tatsache, daß die Ausscheidung desselben im großen und ganzen mit dem Gesamt-

eiweißumsatze Schritt hält, kann vielleicht in dem Sinne gedeutet werden, daß das Zellmaterial des Körpers bei der Assimilation von Eiweißnahrung gerade in einer Weise in Anspruch genommen werde, daß es dabei zu einer vermehrten Abnützung des Protoplasmas und einer Abstoßung jener (den Kräften des intermediären Stoffwechsels gegenüber resistenten) Imidazolkomplexe kommt, die schließlich als Diazochromogen im Harn zum Vorschein kommen.

11. Als ein Anteil der Oxyproteinsäurefraktion verhält sich in dieser Hinsicht das Diazochromogen der ersteren ganz analog, wie ja auch der in den Oxyproteinsäuren enthaltene neutrale Schwefel bekanntlich unverkennbare Beziehungen zum Zerfalle des Körperprotoplasmas erkennen läßt.

Über den Energiegehalt des menschlichen Harnes bei chronischer Unterernährung und bei kachektischen Zuständen. Zugleich ein Beitrag zur Methodik der Harncalorimetrie.

Von

Otto Fürth und Hedwig Kozitschek.

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Institutes der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 26. Mai 1919.)

Mit 3 Figuren im Text.

I.

Einleitung.

Trotzdem die calorimetrischen Methoden schon seit mehreren Dezennien in der Biologie heimisch geworden sind, sind dieselben gerade in bezug auf die Ermittelung des Energiegehaltes des menschlichen Harnes von den Physiologen schwerlich in jenem Umfange ausgenutzt worden, der ihrer Bedeutung vollkommen angemessen gewesen wäre. Die Pathologen und Kliniker aber haben werkwürdigerweise diesen wichtigen Forschungsbehelf, der sich doch auf anderen Gebieten so vortrefflich bewährt hatte, bisher so gut wie gänzlich abseits liegen lassen.

Systematische Untersuchungen, die auf Anregung A. Durigs letzterer Zeit im hiesigen Institute über Veränderungen des Stoffwechsels bei chronischer Unterernährung ausgeführt worden sind und zu denen die Ernährungsverhältnisse in Wien während des letzten Kriegsjahres nur allzu reichliches

Material geboten hatten[1]), ließen neben anderen Gesichtspunkten auch Aufschlüsse über den Energiegehalt des Harnes bei unterernährten Individuen wünschenswert erscheinen; im Zusammenhange damit haben wir auch andere kachektische Ernährungsstörungen in den Kreis unserer Untersuchungen einbezogen. Die Hoffnung, mit der wir an diese Untersuchungen herangetreten sind, gleichzeitig der Erforschung der Schlackenstoffe des Stoffwechsels, insbesondere der Oxyproteinsäuren, die schon seit Jahren in diesem Laboratorium nach verschiedenen Richtungen hin studiert worden sind, dienstbar sein zu können, hat uns, wie wir glauben, nicht getrogen.

Bevor wir aber an die Wiedergabe unserer eigenen Untersuchungen herangehen, möchten wir in aller Kürze die wichtigsten Literaturangaben erwähnen, deren wir zur Beurteilung unserer Resultate bedürfen. Die letzteren beziehen sich im wesentlichen auf den calorischen Quotienten (Cal/N), der angibt, wie viele Calorien auf je ein Gramm ausgeschiedenen Stickstoffes entfallen.

In bezug auf den calorischen Quotienten des menschlichen Harnes konnten wir nur aus der Literatur im wesentlichen etwa folgendes ermitteln:

Nach Rubner und Heubner[2]) beträgt der Quotient beim Erwachsenen bei Milchnahrung im Mittel 7,71, bei Fleischnahrung 7,45, im Hungerzustande 8,49. Tangl[3]) fand den Quotienten Cal/N bei vorwiegender Fettnahrung 8,6 bis 10,5, bei vorwiegender Kohlenhydratnahrung jedoch erheblich höher, 11,3 bis 13,2. A. Loewy und N. Zuntz fanden in Selbstversuchen bei gemischter Ernährung den calorischen Harnquotienten 8,15 bis 8,81; Caspari fand bei positiver N-Bilanz 9,8, bei verringerter N-Zufuhr dagegen nur 7,7[4]). Schloßmann und Moro[5]) fanden bei Ernährung des Erwachsenen mit Kuh- und Frauen-

---

[1]) Vgl. A. Durig, Antrittsvorlesung, gehalten am 31. Oktober 1918. Wiener med. Wochenschr. **1918**, Nr. 44; auch separat: Verlag von Moriz Perles, Wien 1918; ferner Klara Kohn, Wiener klin. Wochenschr. **32**, Nr. 6, 1919, und O. Fürth, Über die Diazoreaktion des normalen Menschenharnes und die Abhängigkeit des Diazowertes von der Ernährungsart, diese Zeitschr. **96**, 269, 1919.

[2]) M. Rubner und O. Heubner, Zeitschr. f. Biol. **36**, 54, 1898. — M. Rubner, ibid. **36**, 72, 75, 1898.

[3]) F. Tangl, Arch. f. (Anat.) u. Physiol., Suppl. **1899**, 258.

[4]) A. Loewy, Arch. f. (Anat.) u. Physiol. **1901**, 317. — W. Caspari, ibid. 334.

[5]) A. Schloßmann und E. Moro, Zeitschr. f. Biol. **45**, 285, 1904.

milch Werte von 7,56 bzw. 9,98; Caspari und Gläßner[1]) beobachteten bei einem streng vegetarisch lebenden Ehepaar kalorische Quotienten von 11,09 bis 15,06 (beim Manne) nnd 7,14 bis 11,93 (bei der Frau). Bei alleiniger Aufnahme von rohem Obste fand Caspari[2]) einmal einen Quotienten von 18,90. — Beim Aufstieg auf den Monte Rosa ermittelten Zuntz, Loewy, Müller und Caspari[3]) bis zu einer Höhe von 2100 m Werte von 8,43 bis 9,36, in 4500 m Höhe jedoch (während des Bestehens mehr oder weniger intensiver Bergkrankheit) Werte von 9,56 bis 11,12.

Zahlreiche sorgfältige Ermittelungen des calorischen Quotienten im normalen Zustande wie im Hunger rühren von F. G. Benedict[4]) und seinen Mitarbeitern her. Bei normalen Individuen fanden sich in 58 Ruhe- und Arbeitsversuchen Werte von 7,3 bis 8,94 (Mittel 8,09). Bei einem früheren Hungerversuche (Wesleyan University 1907) fanden sich calorische Quotienten von 8,0 bis 19,75. Benedict ist der Meinung, der letztere außerordentlich hohe Wert dürfte durch das Auftreten von β-Oxybuttersäure im Hungerharne bedingt gewesen sein; leider existieren aber keine Analysen, welche darüber eine Entscheidung gestatten würden. Sehr genaue Beobachtungen liegen über einen Hungerkünstler vor, dessen Stoffwechsel Benedict später (Carnegie Institution 1912) während einer 31 tägigen Hungerperiode studiert hat. Vor Beginn des Hungerns gab der calorische Quotient normale Werte (8,91 bis 9,01); während der ganzen Dauer des Hungerversuchs aber stellte er sich auf ein erhöhtes Niveau ein (2. bis 10. Tag: 10,40 bis 11,54; 11. bis 20. Tag: 10,36 bis 13,28; 21. bis 31. Tag: 11,11 bis 12,04).

„Bei Kranken“, sagt A. Loewy[5]), „scheint bisher nur von Plesch[6]) der calorische Quotient des Harns ermittelt und erhöht gefunden zu sein. Plesch stellte ihn bei einem Phthisiker während des letzten Lebenstages zu 16,38 fest.“

Worauf die Erhöhung des calorischen Quotienten bei abnormer Ernährung und unter pathologischen Verhältnissen beruht, ist ganz unklar.

---

[1]) W. Caspari und K. Gläßner, Zeitschr. f. diät. u. physikal. Ther. 7, 483, 1904.

[2]) W. Caspari, Arch. f. d. ges. Physiol. **109**, 473, 1905.

[3]) Zuntz, Loewy, Müller, Caspari, Höhenklima und Bergwanderungen, Berlin **1906**, 286.

[4]) F. G. Benedict, A study of prolonged fasting, Washington, published by the Carnegie Institution of Washington **1915**, 294, 297 bis 298. Vgl. auch: Benedict and Milner, U. S. Dep. Agr. Office Sta. Bull. **175**, 145, 1907. — Benedict, Carnegie Inst. of Wash. Publ. **77**, 1907, 493. — Benedict and Diefendorf, Amer. Journ. Physiol **18**, 362, 1907.

[5]) A. Loewy, Calorimetrie in C. Neubergs Handbuch „Der Harn“, II. Teil, 1322 bis 1336.

[6]) J. Plesch (II. mediz. Klinik, Berlin), Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. **3**, 455, 1906.

A. Loewy[1]) meint, daß aromatische Substanzen (bei Herbivoren Hippursäure!) dabei wohl eine Rolle spielen und daß entweder stickstofffreie oder stickstoffärmere Substanzen im Harne auftreten. „Bei den stickstofffreien Stoffen handelt es sich im wesentlichen um die verschiedenen Arten der im Harne beobachteten Kohlehydrate (Amylum, Hexosen, Pentosen, Heptosen?) und um gepaarte und nicht gepaarte Glucuronsäuren. Ihre Art und Menge bestimmt den Zuwachs an Brennwert. Ferner bilden eine häufige Quelle einer abnormen Steigerung des Quotienten die sogen. Acetonkörper (Aceton, Acetessigsäure, β-Oxybuttersäure) und flüchtige Fettsäuren . . . Von stickstoffhaltigen abnormen Harnbestandteilen wären zu nennen, abgesehen von Eiweiß, Cystin, Amine und Aminosäuren" . . .

Schloßmann und Moro[2]) waren der Meinung, die Steigerung des Quotienten bei Frauenmilchernährung sei auf ein Plus von Harnsäure zu beziehen.

Steyrer[3]), der den Energieumsatz beim Fieber, Myxödem und beim Morbus Basedowii untersucht hat, gelangt auf Grund der Beobachtung des Brennwertes sowie der Relation C/N zu der Annahme, daß im Harne Fiebernder zugleich mit der vermehrten Harnstoffausscheidung ein Zurücktreten anderer C-haltiger Stoffe eingetreten sei, die vorher am Brennwerte des Harnes beteiligt waren.

Endlich erschließt Plesch[4]) in seinem Falle aus einer abnorm hohen Relation C/N zugleich mit dem hohen Brennwerte, es handle sich um inneren Sauerstoffmangel, der das Auftreten nicht völlig oxydierter Eiweißabbauprodukte im Harne zur Folge habe.

Wie ersichtlich, ist die ganze Frage über das Stadium der vagen Vermutungen nicht hinaus gediehen und ist eine experimentelle Begründung einer derselben bisher nicht einmal ernstlich versucht worden.

II.

Zur Technik der Harncalorimetrie.

Wenn die Harncalorimetrie sich bisher auf den Kliniken nicht einzubürgern vermochte, sondern eigentlich nur ein Privileg einiger physiologischer Laboratorien geblieben ist, so liegt das unseres Erachtens nicht so sehr daran, daß eine kostspielige und ziemlich komplizierte Apparatur dazu erforderlich ist, als vor allem in dem Umstande, daß der Vorgang der Vorbereitung

---

[1]) A. Loewy, Calorimetrie l. c. S. 1335.

[2]) l. c.

[3]) A. Steyrer (II. med. Klinik, Berlin), Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 4, 735, 1907.

[4]) l. c.

des Harnes zur calorimetrischen Bestimmung sich recht umständlich und mühselig gestaltet hat.

Wir haben uns bei der Harncalorimetrie im großen und ganzen an den Vorgang der Verbrennung in der Berthelotschen Bombe gehalten, wie er in den vortrefflichen Abhandlungen von Hári und Weiser[1]) sowie von A. Loewy[2]) eingehend beschrieben ist. In bezug auf einzelne Technizismen sind wir jedoch von diesem Vorgange abgewichen. Wenn wir nun eine genaue Beschreibung dieser Abweichungen folgen lassen, so geschieht es deswegen, weil dieselben den Vorgang der Harncalorimetrie, wie wir glauben, wesentlich bequemer, einfacher und weniger zeitraubend gestalten und weil wir Anderen die Verluste an Zeit und Kraft ersparen möchten, die uns selbst durch Fehlversuche mannigfacher Art verursacht worden sind.

a) Konservierung der Harne. Zur Konservierung unserer Harne diente uns stets das Toluol, das auch von Hári und Weiser zu diesem Zwecke empfohlen worden ist. Die Harnflaschen wurden an einem kühlen Orte aufbewahrt. Es erwies sich als notwendig, die Reaktion des Harnes vor der Verarbeitung mit Lackmuspapier zu prüfen. Nur amphotere oder schwach alkalisch reagierende Harne wurden verarbeitet; solche dagegen, die (trotz des Tuluolzusatzes) stärker vergoren waren, wurden verworfen.

b) Eintrocknungsverfahren. Mehrere Proben des zu untersuchenden Harnes zu je 20 ccm wurden ohne irgendeinen Zusatz in Porzellanschälchen am lebhaft siedenden Wasserbade zum Sirup gedampft, was meist nur wenig mehr als eine Stunde in Anspruch nahm. Der heiße Harnsirup wurde mit 1 bis 2 g reiner Kieselgur[3]) versetzt und mit Hilfe eines kleinen Glasspatels sorgfältig durchgeknetet, eventuell noch einige Zeit am Wasserbade gelassen. Das Gemenge bildet schließlich eine krümelige, den Wänden des Schälchens nur locker anhaftende, in keinem Falle aber klebrige Masse. Um die Trocknung zu vollenden, haben wir die Schälchen in der Regel über Nacht auf einem Etagengestelle über Schwefelsäure unter eine ver-

---

[1]) P. Hári und St. Weiser, Calorimetrische Verbrennung, Abderhaldens Handb. der biochem. Arbeitsmethoden 1, 658 bis 685, 1910.

[2]) A. Loewy, Calorimetrie l. c.

[3]) Die zur Anwendung gelangende Kieselgur wurde vorsichtshalber einige Stunden lang mit konzentrierter Salzsäure ausgekocht, ausgewaschen und noch einmal geglüht.

schraubbare Luftpumpenglocke gebracht, in der mit Hilfe einer Ölluftpumpe ein hochgradiges und dauerhaftes Vakuum erzeugt wurde. Zuweilen haben wir, ohne einen Nachteil zu bemerken, die Vakuumtrocknung und damit das ganze Vorbereitungsverfahren auf wenige Stunden eingeschränkt und dann sogleich die Verbrennung angeschlossen.

Um den durch den Eintrocknungsvorgang hervorgerufenen Stickstoffverlust in Rechnung zu ziehen, wurden 2 Proben zu je 10 ccm Harn in genau derselben Weise mit Kieselgur eingetrocknet und darin sodann der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl ermittelt. 2 weitere Proben des nativen Harnes wurden direkt dem Kjeldahlverfahren unterworfen. Aus der Differenz der für je 10 ccm Harn umgerechneten Mittelwerte vor und nach der Trocknung wurde die „Rubnersche Stickstoffkorrektur[1]) berechnet, d. i. für je 1 g verloren gegangenen Stickstoffs entsprechend dem Energiegehalt des Harnstoffes 5407 cal.

A. Loewy[2]) empfiehlt, da der Energieverlust des Harnes mit der Temperatur, bei der die Eintrocknung vorgenommen wird, wächst, und zwar mehr beim Erhitzen auf dem Wasserbade als im Vakuum, die Trocknung bei Zimmertemperatur im Vakuum vorzunehmen. Da aber, wie bereits Rubner hervorgehoben hat und wir bestätigen können, manche Harne bei Zimmertemperatur nur zur sirupösen Konsistenz gebracht werden können, empfiehlt er für diese Fälle die Trocknung im Vakuum bei 50 bis 70°. Zaitschek[3]) (aus dem Laboratorium von Tangl) empfiehlt das Eindampfen im Vakuum bei 40 bis 50°. Wer im Besitze eines gut funktionierenden Vakuumtrockenschrankes ist (was bei uns bisher nicht der Fall war), wird einen solchen also sicherlich zweckmäßigerweise zur Harntrocknung verwenden können. Doch glauben wir, daß die Vorteile einer langsameren Trocknung bei niederer Temperatur und einer

---

[1]) Nach den Feststellungen von Farkas und Korbuly (Laboratorium von Tangl), Arch. f. d. ges. Physiol. **104**, 1904, ist es für Stoffwechseluntersuchungen praktisch ziemlich gleichgültig, ob man die Rubnersche Korrektur oder die Krummachersche Korrektur (6500 cal für 1 g verloren gegangenen Ammoniaks) in Rechnung zieht.

[2]) l. c. S. 1324.

[3]) A. Zaitschek, Arch. f. d. ges. Physiol. **121**, 550, 1908.

schnelleren Trocknung bei höherer sich bei Anwendung der Rubnerschen Korrektur in praxi so ziemlich ausgleichen dürften. Auch A. Loewy betont ausdrücklich, daß auch die Dauer der Trocknung von Einfluß ist; je schneller sie geschieht, desto kleiner sei der Verlust.

Machen wir uns doch klar, auf was es denn eigentlich ankommt! Vor allem handelt es sich bei einem etwa schwach alkalischen Harne um das Entweichen des präformierten Ammoniaks. Die beim Eindampfen flüchtigen N-haltigen Verbindungen", meint Zaitschek, „haben sich schon beim ersten Eindampfen verflüchtigt, so daß bei derselben Temperatur weder durch weitere Trocknung (24 bis 48 Stunden) noch durch neuerliches Auflösen des Harnes der N-Verlust vergrößert wird". Daß leicht flüchtige Substanzen, wie etwa das Aceton, wie immer man die Harntrocknung ausführen möge, für die Brennwertbestimmung verloren gehen, ist selbstverständlich.

Mit dem Entweichen präformierten Ammoniaks ist aber die Sache sicherlich nicht abgetan. Zweifellos unterliegt bei jeder Trocknungsprozedur auch ein Bruchteil des Harnstoffes der hydrolytischen Spaltung zu Kohlensäure und Ammoniak. So hat z. B. Schloßmann[1]) festgestellt, daß wenn man aus einem Harne, der beim Kochen $3^1/_2\,^0/_0$ seines N verlor, durch einen Luftstrom das Ammoniak entfernt hatte, noch beim Kochen hinterher $1{,}6\,^0/_0$ N verloren gingen. Er meinte, dieser Verlust werde teilweise verhindert, wenn man die von saurem Phosphate herrührende Acidität des Harnes mit Soda abstumpft. Doch auch das führe zu keinem befriedigenden Ergebnisse usw. Die Sache liegt ja doch wohl so, daß in dem komplizierten Salzgemenge des Harnes, in dem Carbonate und Phosphate in bekannter Weise sich nach dem Massenwirkungsgesetze umsetzen, im allgemeinen beim Eindampfen ein Plus, sei es von freien Hydroxylionen, sei es von freien Wasserstoffionen dem Harnstoff gegenüber zur Geltung kommen und die langsame hydrolytische Spaltung desselben bewirken wird. Diesem Umstande tragen wir ja eben durch die Rubnersche Korrektur in ausreichender Weise Rechnung und braucht uns dies weiter keinen Kummer zu bereiten.

Daß sich dies tatsächlich so verhält, kann man aus den sorgfältigen methodischen Versuchen von Farkas und Korbuly[2]) entnehmen. Dieselben haben Harnproben sehr lange Zeit hindurch (2 bis 5 Tage) einerseits bei Wassertemperatur, andererseits aber im Vakuum bei 40 bis 50° getrocknet und die N-Verluste ausgewertet. Berechnet man nun aber aus ihren Versuchsdaten unter Anwendung der Rubnerschen Korrektur den Brennwert des nativen Harnes, so erhält man (mit Ausnahme des

---

[1]) l. c.
[2]) l. c.

nicht einwandfreien Versuches I[1]) bei beiden Trocknungsarten durchaus übereinstimmende Mittelwerte:

			Wasser-bad	Vakuum	Differenz in $^0/_0$
Menschenharn	Versuchsreihe	I	797 cal	900 cal	−11
„	„	II	695 „	713 „	− 2,5
„	„	III	1444 „	1448 „	− 0,3
Mittel aus 3 Versuchen Schafharn	„	V	2419 „	2453 „	− 1,4
„ Ochsenharn	„	VI	1816 „	1814 „	− 0,1
„ Pferdeharn	„	VIII	1762 „	1771 „	− 0,5
„ Hundeharn	„	IX	2555 „	2544 „	− 0,4

Eine Quelle für den Verlust an Energie beim langdauernden Eindampfen des Harnes kann sicherlich unter Umständen auch die Hippursäure bilden, wenn nämlich eine Spaltung derselben zu Benzoesäure und Glykokoll erfolgt und keine Basen vorhanden sind, um die erstere zu binden (das wäre z. B. der Fall, wenn man den Harn mit einer Mineralsäure ansäuert und dann eindampft). In diesem Falle könnte Benzoesäure (und natürlich auch jede andere etwa vorhandene flüchtige aromatische Säure) verloren gehen. Für unsere Versuchsbedingungen dürfte aber diese Fehlerquelle schwerlich in Betracht kommen.

Eher muß man daran denken, daß bei der Eintrocknung, außer dem Ammoniak, auch andere flüchtige Basen, die Zersetzungsvorgängen ihre Entstehung verdanken, entweichen können. So hat z. B. seinerzeit Kinoshita[2]) in diesem Laboratorium festgestellt, daß zwar der normale, ganz frische und unzersetzte Harn nur Spuren abdestillierbaren Trimethylamins enthält. Nicht ganz unbeträchtliche Mengen davon (mehrere Zentigramm im Liter) konnten dagegen aus Harnen gewonnen werden, die mit oder ohne Toluolzusatz längere Zeit bei Zimmertemperatur gestanden hatten. Vermutlich handelt es sich dabei um die Abspaltung der Base aus einer Muttersubstanz durch fermentative Vorgänge. Auch das Methyl- und Dimethylguanidin und andere Harnbasen unbekannter Art dürften hier in Betracht kommen[3]), die den charakteristischen Geruch des

---

[1]) Die Versuchsreihe I, die zugunsten des Vakuumverfahrens eine Differenz von 11$^0/_0$ ergibt, kann nicht für einwandfrei gelten. Es heißt diesbezüglich (S. 130): „Das Eindampfen gelang nicht vollständig, so daß wir den nicht einwaschbaren Rückstand mit dem Messer auskratzen mußten."

[2]) T. Kinoshita (Chem. Abt. d. Physiol. Inst. d. Wien. Univ.), Centralbl. f. Physiol. 24, Nr. 17, 1910.

[3]) Vgl. diesbezüglich O. Fürth, Probleme der physiol. und pathol. Chemie 2, 131 bis 137, 1913.

Harnrückstandes veranlassen. Wir waren übrigens überrascht, feststellen zu können, daß Harnrückstände, die nach unserem Trocknungsverfahren gewonnen worden waren, meist einen ausgesprochenen Fleischextraktgeruch aufwiesen, während Parallelproben, die wir nach dem kurzdauernden Eindampfen am Wasserbade, statt im Vakuum, etwa über Nacht im Trockenschrank bei 100^0 und darüber gehalten hatten, die vor sich gegangenen Zersetzungsvorgänge schon am Geruche (dem bekannten „urinösen" Geruche) erkennen ließen.

Die Gefahr von N-Verlusten infolge fermentativer oder bakterieller Zersetzungsvorgänge bei dem sich auf mehrere Tage ausdehnenden Eindunstungsvorgang läßt auch die ganz außerordentlich umständliche und zeitraubende Harntrocknung mit Hilfe der Kellnerschen Celluloseblöckchen als sehr wenig einladend erscheinen; ganz abgesehen davon, daß es nicht sonderlich zweckmäßig ist, gerade den geringen Brennwert substanzarmer und darum schwer verbrennlicher Harne gewissermaßen unter einem übergroßen Haufen von Cellulosecalorien zu begraben.

c) Adjustierung des Harnrückstandes im Platinschälchen. Wir verbrannten unsere Harnrückstände anfänglich in dem kleinen Platingefäßchen mit flachem Boden, mit dem die Berthelot-Krökersche Bombe[1]) größerer Façon adjustiert ist. Wir hatten aber dabei viele Mißerfolge zu verzeichnen, insofern manche unserer (meist abnorm substanzarmer) Harne bei der Verbrennung einen mehr oder minder reichlichen Kohlenrückstand hinterließen und wir uns genötigt sahen, eine „Kohlenkorrektur" bei unseren Werten anzubringen[2]). Auch frühere Beobachter haben vielfach mit diesem Übelstande zu kämpfen gehabt. Es kann übrigens leicht geschehen, daß man, wenn man im erwähnten kleinen Platin-

---

[1]) Aus der Werkstätte von Julius Peters, Berlin NW, Thurmstraße 4.

[2]) Wir ermittelten die Kohlenkorrektur nach dem Vorschlag von Hári und Weiser (l. c. S. 684) in der Art, daß wir den Verbrennungsrückstand in warmer verdünnter Salzsäure in Lösung brachten, die ungelösten Kohlenkrümelchen auf einem Goochfilter sammelten und mit Wasser auswuschen. Dann haben wir den Tiegel bei 120^0 getrocknet, gewogen, kurze Zeit geglüht (bis die Kohle verschwunden war) und schließlich wieder gewogen. Der Gewichtsverlust wurde als Kohle in Rechnung gebracht und der Brennwert derselben zum Brennwert des Harnes hinzuaddiert.

gefäß verbrennt, die unverbrannt gebliebenen Kohlenpartikelchen ganz übersieht: Die Harnasche erscheint rein weiß und man meint, die Verbrennung sei vollständig gewesen. Wenn man aber den Boden des Tiegels genau untersucht, findet man oft genug, bedeckt von einer Glasur von Harnasche an der Wand des Gefäßes einen Kohlenanflug, oder aber man findet Kohlenkrümelchen, die in der dem Boden fest anhaftenden Salzmasse eingebettet liegen.

Nach zahlreichen Fehlversuchen ergab sich uns schließlich ein einfacher Kunstgriff, der uns der Sorge betreffs der Kohlenkorrektur überhoben hat. Es war uns aufgefallen, daß sich die Kohle in der Regel nicht im Innern der Harnasche fand, sondern meist an der Oberfläche, zumal an der Wand des Platingefäßes, offenbar dort, wo an einer die Wärme gut leitenden Oberfläche eine allzuschnelle Abkühlung und infolgedessen eine unvollständige Verbrennung stattgefunden hatte.

Wir haben daher den trocknen Harnrückstand nicht unmittelbar mit der Wand des Verbrennungsschälchens in Berührung gebracht, vielmehr durch eine Lage von Kieselgur vor einer Berührung mit der Gefäßwand geschützt. Das hat sich in der Tat auf das beste bewährt, derart, daß wir fast ausnahmslos eine ganz glatte Verbrennung auch mit salzreichen und an organischer Substanz sehr armen Harnen erzielt haben und keiner Kohlenkorrektur mehr bedurften. Schlimmstenfalls war die Harnasche ausnahmsweise nicht rein weiß, sondern von einem Kohlenanflug diffus schiefrig verfärbt. Doch waren selbst dann mit der Lupe keine distinkten Kohlenpartikelchen zu sehen und war der Kohlenrückstand praktisch unwägbar[1]).

Folgender Vorgang hat sich uns als praktisch erwiesen:

Wir haben das kleine Platingefäß mit flachem Boden beseitigt und durch einen viel geräumigeren Platintiegel (3 cm weit, 16 ccm fassend) ersetzt (Fig. 1, *a*). Derselbe wurde von einem ringförmig gebogenen Kupferdraht (*b*) getragen, der mittels einer federnden Spiralwindung an dem Platinröhrchen (*c*) befestigt war, durch das der Sauerstoff in die Bombe ein-

[1]) War infolge einer Unachtsamkeit der Überzug der Tiegelwand mit Kieselgur schadhaft gewesen, so merkten wir dies zuweilen an einem Kohlenanflug an dieser Stelle.

strömt. In diesen Platintiegel wurden nun etwa 1 bis 2 Kaffeelöffel reiner Kieselgur (*d*) eingebracht und diese letztere nun mit Hilfe eines Spatels unter leichtem Druck derart an die Wände des Tiegels verteilt, daß im Innern ein Hohlraum entstand und die Tiegelwände allenthalben von einer etwa 1 bis 2 mm dicken Kieselgurlage bedeckt waren.

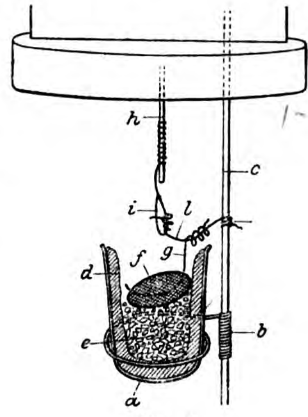


Fig. 1.

Nunmehr wurde der trockne krümlige Harnrückstand (*e*) aus dem Porzellanschälchen in diesen Hohlraum hinein übertragen, was mit Hilfe eines Spatels sehr leicht und ohne Verluste gelang. Die letzten dem Schälchen anhaftenden Partikelchen übertrugen wir, einem Vorgang A. Durigs folgend, mit Hilfe eines oder mehrerer Filtrierpapierscheibchen. Wir haben mit Hilfe eines Korkbohrers aus Filterpapier runde Scheibchen ausgestanzt; 50 derselben wurden bei 100° getrocknet und gewogen. Jede derselben wog 0,02 g. Durch trocknes Auswischen mit derartigen Scheibchen gelang es fast stets, das Porzellanschälchen ganz blank zu erhalten. Das Papierscheibchen (*f*) wurde schließlich, das Ende des Zündfadens (*g*) bedeckend und diesen fixierend, auf die Oberfläche des Harnrückstandes aufgedrückt.

d) Zündvorrichtung. Der aus der zentralen Bohrung der Bombe herunterragende Platinstift (*h*) trägt mittels einer federnden Spiralwindung die Platindrahtschlinge (*i*). Durch diese einerseits und um den Fortsatz am Zuleitungsröhrchen (*k*) andererseits wird ein kurzer, sehr dünner Platindraht (*l*) geschlungen. Eine zentimeterlange Drahtbrücke genügt vollauf, und es ist eine zwecklose Verschwendung des kostbaren Materials, längere Schlingen zu verwenden. Übrigens kann man (wie uns Durig empfohlen hat) sehr wohl statt des Platindrahtes einen dünnen Neusilberdraht verwenden[1]).

[1]) Die Verwendung von Eisendraht ist, A. Durigs Erfahrungen zufolge, weniger empfehlenswert, da die sprühenden Eisenoxydfunken den Emailleüberzug der Bombe schädigen.

An der Drahtbrücke haben wir sodann einen Baumwollfaden von genau bekanntem Gewicht (wir verwendeten solche von 73 mm Länge und einem Brennwert von 22 Calorien) durch einen Knoten befestigt. Das obere Ende des Zündfadens wurde mit Hilfe einer Pinzette um die Drahtbrücke in mehrfachen festen Windungen geschlungen, das untere Ende aber, wie erwähnt, mittels des Papierblättchens auf die Oberfläche des Harnrückstandes aufgedrückt. Wir konnten so die ärgerlichen Fehlzündungen mit Sicherheit vermeiden, während es sonst leicht geschieht, daß der Harn nicht verbrennt, sei es, weil der Baumwollfaden vom glühenden Draht einfach abfällt, ohne sich selbst zu entzünden, sei es, weil der Zündfaden beim Verschrauben der Bombe sich verschoben hat, sei es endlich, weil der an organischer Substanz allzu arme Harnrückstand nicht Feuer gefangen hat. Bei unserem Vorgang hilft das aufflammende Papierscheibchen, das Harnpulver in Brand zu setzen.

Zur Einleitung des elektrischen Stromes in die Bombe bedienten wir uns einer von A. Durig[1]) angegebenen Zündeinrichtung (Fig. 2). Aus dem Gefälle eines Stromkreises,

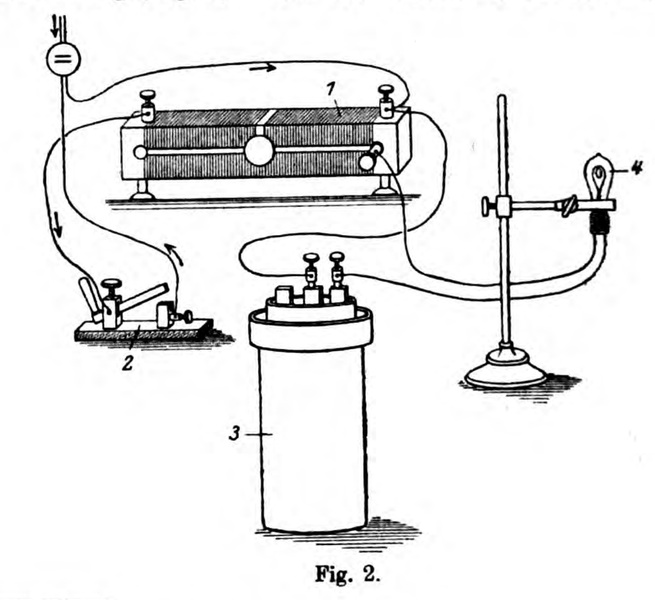


Fig. 2.

[1]) A. Durig, diese Zeitschr. 4, 65, 1907.

in den ein Widerstand (*1*) sowie ein Schlüssel (*2*) eingeschaltet sind, wird ein zweiter Stromkreis abgezweigt, der die Bombe (*3*) sowie eine kleine Glühlampe passiert. Es gelingt leicht, durch Verschiebung des Widerstandes die Stromstärke ein für alle Mal derart zu regulieren, daß, sobald man den Schlüssel (*2*) schließt, die Drahtbrücke in der Bombe durchbrennt, derart, daß das Glühlämpchen (*4*) nach kurzem Aufleuchten erlischt. Sieht man hernach bei einem regelrecht hergerichteten Versuche etwa 20 Sekunden später den Anstieg der Thermometersäule, so weiß man, daß die Zündung gelungen ist.

e) Verschluß der Bombe. Beim Verschrauben der Bombe ist eine unscheinbare Kleinigkeit wohl zu beachten, deren Vernachlässigung für den Arbeitenden aber die Quelle vielen Ärgers werden kann. Es geschieht leicht, daß ein wenig Blei, vom Bleiring im Bombendeckel herrührend, am oberen Rande des unteren Bombenteils fest haften bleibt und diesen uneben macht. Dann schließt die Bombe schlecht, und man muß, um überhaupt einen Verschluß zu erzielen, Gewalt beim Zuziehen anwenden. Dabei leidet aber wieder der tief eingepreßte Bleiring Schaden und wird bald ganz unbrauchbar. Ein solcher Vorgang ist durchaus fehlerhaft und wird vermieden, wenn man durch sorgfältiges Putzen, Blankhalten und leichtes Einfetten des Bombenrandes das Festlegen von Blei verhindert. Eine richtig funktionierende Bombe muß ohne jede Gewaltanwendung schließen, ohne daß auch nur eine Gasblase entweicht, und ein gut schließender Bleiring kann bei sehr zahlreichen Verbrennungen dienen, ohne eines Austausches zu bedürfen.

f) Calorimeterwasser. Eine wesentliche Ersparnis an Zeit haben wir dadurch erzielt, daß wir das Calorimeterwasser, in das die Bombe versenkt wird, abgemessen haben, statt es, wie üblich, abzuwiegen[1]). Zu diesem Zweck diente uns

[1]) Mit Rücksicht auf die wechselnde kubische Ausdehnung des Wassers bei wechselnden Temperaturen könnte es vielleicht auf den ersten Blick hin nicht ganz unbedenklich erscheinen, wenn die Wägung des Wassers durch eine Abmessung des Wasservolumens ersetzt wird. Tatsächlich ist dieses Bedenken aber nicht begründet. Bei weitaus der Mehrzahl unserer Versuche schwankte die Temperatur des Wassers in unserem großen Vorratsgefäß nur zwischen $12\,^1/_2$ bis $14\,^1/_2{}^0$; nur ausnahmsweise kamen höhere und niedere Temperaturen zwischen den Extremen $9\,^1/_2$ bis 15^0 vor. Berechnet man nun mit Hilfe der Formel $v_c = v_0\,(at + bt + ct^3)$ die kubische Ausdehnung des Wassers (nach den Zahlen von Kopp, Chemiker-Kalender 1917 II, 101), so ergibt sich $v_{10} = 1{,}000\,16\,v_0$ und $v_{15} = 1{,}000\,82\,v_0$. Die sich hier ergebenden Unterschiede liegen also gänzlich innerhalb der Fehlergrenzen.

eine von Prof. Durig herrührende und von ihm früher benutzte zweckmäßige Einrichtung, die aus nebenstehender Skizze (Figur 3) ersichtlich ist. In einem großen 50 l fassenden Blechgefäß (*a*) wurde das Wasser unter gutem Durchmischen durch Zusatz von warmem oder von kaltem Wasser auf die gewünschte Temperatur gebracht, die an einem in Zehntelgrade geteilten Thermometer genau abgelesen wurde. Sodann wurde mit Hilfe eines Hebers (*d*) das Wasser in die große, mehr als 2 l fassende Glasbirne (*b*) bis zu der Marke im Steigrohre (*c*) eingelassen, der seitliche Hahn (*h*) geschlossen, der untere Hahn (*e*) geöffnet und das Wasser in das untergestellte Calorimetergefäß (*f*) abgelassen. Das Volumen der Glasbirne bis zur Marke (*c*) einerseits, bis zu den beiden Glashähnen (*e* und *h*) anderseits gerechnet, wurde durch eine Reihe von Wasserwägungen genau ermittelt.

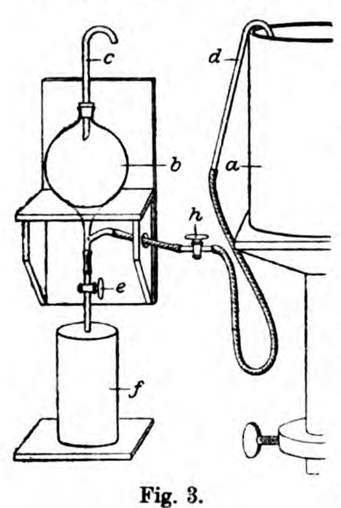


Fig. 3.

g) Unterkühlung. Wir haben auf eine richtig gewählte Unterkühlung großen Wert gelegt und (unter genauer Kontrolle der Wasser- und Zimmertemperatur mit Hilfe zweier in Zehntelgrade geteilter Thermometer) am liebsten das Calorimeterwasser, das die Bombe umgab, entsprechend dem zu gewärtigenden Temperaturanstieg derart temperiert, daß auf der Höhe des letzteren der Stand des eintauchenden Beckmann-Thermometers womöglich gerade der Zimmertemperatur entsprach. Bei der Verbrennung von je 20 ccm unserer an organischer Substanz meist recht armer Harne hatten wir es meist nur mit Temperaturanstiegen um 0,2 bis 0,7^0 herum zu tun, derart, daß steile Temperaturgefälle kaum jemals vorkamen, wie sie bei der Verbrennung calorienreicher Substanzen in den üblichen Mengen wohl kaum praktisch vermieden werden können. Bei der großen Mehrzahl unserer Versuche hat sich in der Vorperiode das Thermometer sehr bald auf eine ganz konstante Temperatur eingestellt, nachdem das von einem

Elektromotor in einem Tempo von 90 Huben in der Minute betriebene Rührwerk in Gang gesetzt worden war, derart, daß $v = o$ wurde (s. u.). Jedoch auch in der Nachperiode blieb sehr häufig die Thermometersäule auf dem höchsten Stand, den sie erreicht hatte (ϑ_n) viele Minuten lang ganz unverändert stehen, so daß auch $v_1 = o$ wurde. Wir konnten uns also meist die umständliche Berechnung der Temperaturkorrektur ganz ersparen.

h) Berechnungsmodus.

Schließlich noch ein paar Worte über den Berechnungsmodus: Dort wo sich dennoch eine Temperaturkorrektur nicht vermeiden ließ, wurde dieselbe nach der Regnault-Pfaundler-Stohmannschen Formel[1])

$$\Delta t = \frac{v - v^1}{\tau' - \tau}\left(\sum_{n-1}^{1}\vartheta + \frac{\vartheta_o + \vartheta_n}{2} + \frac{\vartheta_1 - \vartheta_o}{9} - n\tau\right) - nv$$

berechnet.

Die Berechnung der erzielten Verbrennungswärme ergab sich nach der Formel

$$V = (W + W_b)\, T_{corr} - (St + Z + P);$$

wo W die Menge des Calorimeterwassers (in unserem Falle $W = 2209$),

W_b den Wasserwert des Apparates,

T_{corr} den korrigierten Temperaturanstieg ($T = \vartheta_n - \vartheta_o$) bedeutet: $T_{corr} = T \pm \Delta t$,

St die Stickstoffkorrektur (für je 1 ccm titrierter $^n/_{10}$-Säure = 1,4 cal),

Z den Brennwert des Zündfadens,

B den Brennwert des mitverbrannten Filtrierpapieres bedeutet.

Den Wasserwert unseres Apparates haben wir nach der Formel

$$W_b = \frac{V + St + Z}{T} - W$$

durch Verbrennung genau gewogener Naphthalin-, Salicylsäure- und Hippursäurepastillen ermittelt. Es ergaben sich die Werte

370, 367, 351, 364, 365, 342, im Mittel 358.

Eine Reihe von Jahren vorher hatte A. Durig für dieselbe Bombe und (zum mindesten der Hauptsache nach) dieselbe Apparatur einen Mittelwert von 353,4 gefunden.

Eine Probeberechnung des Brennwertes von Hippursäure auf Grund einer Verbrennung ergab:

5655 gefunden,
5659 berechnet nach Landoldt-Börnsteins Tabellen,
5660 „ „ Emery und Benedict[2]).

---

[1]) Vgl. Näheres bei Hári und Weiser, l. c. S. 692.

[2]) A. G. Emery und F. G. Benedict, Americ. Journ. of Physiol. 28, 301.

Tabelle

Energiehalt des Harnes bei

Laufende Nr. des Versuches	Name der Versuchsperson	Körpergewicht	Bezeichnung der Krankenanstalt	Diagnose	Calorien-Gehalt der Tagesnahrung	N-Gehalt der Tagesnahrung	Menge des Tagesharnes	N-Gehalt des Tagesharnes	N-Bilanz	N-Gehalt von 10 ccm des nativen Harnes
		kg			Cal.	g	ccm	g		
21, 22, 24, 25, 23	Aushilfsdienerin Marie Schmidt	47	—	Kompensiertes Vitium cordis	?	?	1000	3,50	—	0,0350, 0,0350 } 0,0350
30, 32	Institutsdiener Franz Schneck	70	—	—	1009	7,47	1400	8,08	− 0,61	0,0596, 0,0557 } 0,0577
33, 34	Frau Kolar	48	—	—	1191	7,24	800	2,76	+ 4,48	0,0350, 0,0340 } 0,0345
35, 36	Marie Schiroky	62	Gynäkol. Abt. Prof. Wertheim	Gynäkol. Leiden, Rekonvaleszent	1364	10,80	2100	10,29	+ 0,51	0,0490, 0,0490 } 0,0490
37, 38	Anna Pawalka	48	Med. Klinik Prof. Ortner	Rekonvaleszent nach Phlebitis	2095	15,46	3000	22,17	− 6,71	0,0816, 0,0801 } 0,0808
39, 40	Frl. Cerletti	55	do.	Apicitis	2000	7,64	1600	8,80	− 1,16	0,0459, 0,0451 } 0,0455
42	Prof. Franz Süß	67	—	—	2556	15,88	1600	6,77	+ 8,41	0,0560, 0,0576 } 0,0568
45, 44	Hofrat Prof. Wirtinger	67	—	—	?	?	?	?	?	0,0756, 0,0760 } 0,0758
46, 47	Johann Leopoldseder	58	Med. Abteilung Prof. Wiesel	Rekonvaleszent nach Grippe	1973	6,80	2500	6,90	− 0,10	0,0276, 0,0276 } 0,0276
62, 63					1934	9,60	2500	11,05	− 1,90	0,0324, 0,0324 } 0,0330
51, 53, 54	Johann Spörker	54	do.	Rekonvaleszent nach Grippe-Pneumonie	1934	9,60	1600	10,40	− 0,80	0,0662, 0,0634 } 0,0648
52, 56	Franz Wyrial	62	do.	Rekonvaleszent nach Grippe	1934	9,60	2200	9,40	+ 0,20	0,0424, 0,0436 } 0,0430
55, 57, 58	Alois Marek	56	do.	do.	1934	9,60	1200	12,20	− 3,70	0,0878, 0,0882 } 0,0880
60, 61	Rudolf Engler	62	do.	Rekonvaleszent nach Pleuritis	1934	9,60	2200	6,50	+ 3,00	0,0280, 0,0300 } 0,0290

I.

chronischer Unterernährung.

N-Verlust beim Aufbewahren und Trocknen für 10 ccm Harn	Energiegehalt des nativen Harnes in 10 ccm kleine Cal		Energiegehalt des nativen Harnes im Tagesharn große Cal	Von den Nahrungscalorien gingen mit dem Harne verloren %	Calorischer Quotient Cal./N	Reaktion des Harnes zur Zeit der Verarbeitung	Verbrennungsmodus	Anmerkung
0,0070	364 371 365 378 361	**368**	37	—	**10,5**	amphoter	Trocknung ohne Säurezusatz " " " " nach Neutral. mit HCl " " " " " " " " " "	Kohlenkorrektur
0,0032	581 601	**590**	83	8,2	**10,2**	schwach alkalisch	Verbrennung mit Kieselgur und Papierblättchen ohne weiteren Zusatz in der klein. Platinschale	do.
0,0138 0,0123 } 0,0130	394 396	**395**	32	2,7	**11,4**	z. stark alkalisch	do.	Keine Kohle
0,0125 0,0149 } 0,0137	454 424	**439**	92	6,7	**9,0**	schwach alkalisch	Verbrennung unter Zusatz von 0,75 g Hippursäure in d. kleinen Platinschale	Kohlenkorrektur Keine Kohle
0,0016	749 775	**762**	228	10,8	**9,4**	amphoter	do.	Kohlenkorrektur do.
0,0110	513 543	**528**	84	4,2	**11,6**	do.	do.	Keine Kohle do.
0,0040	416 418	**417**	67	2,7	**7,5**	do.	do.	do.
0,0140	740 722	**731**	—	—	**9,4**	schwach sauer	Verbrennung im großen Platintiegel mit Hippursäurepastillen	Kohlenkorrektur do.
0,0031	349 390	**368**	91	4,6	**13,3**	amphoter	do., ohne Zusatz	do.
0,0031	339 331	**335**	84	4,3	**10,6**	do.	do., ohne Zusatz	do.
0,0098	563 536 514	**538**	86	5,0	**8,3**	schwach sauer	Verbrennung im großen Platintiegel mit Hippursäurepastille	Keine Kohle do. do.
0,0128	448 471	**460**	101	5,2	**10,7**	do.	do. do., aber m. Salicylsäurepastille	Kohlenkorrektur Keine Kohlen
0,0005	830 793 818	**814**	98	5,0	**9,2**	amphoter	Verbrennung auf Kieselgurunterlage mit Hippursäure do., mit Salicylsäure	do. do. do.
0,0010	326 335	**337**	73	3,7	**11,4**	do.	do., mit Salicylsäure	do. do.

Tabelle

Energiegehalt des

Name der Versuchsperson	Bezeichnung der Krankenanstalt	Diagnose	Menge des Tages-harnes
Langhammer	Medizinische Klinik Ortner	Carcinoma recti	—
Baumann	Medizinische Klinik Ortner	Sarkom mit Metastasen im Rückenmark	—
Finsterle	Medizinische Klinik Chvostek	Tuberkulose d. Lungen und des Bauchfells (schwere Kachexie)	2000
N. N.	Medizinische Klinik Wenkebach	Perniziöse Anämie (schwere Kachexie)	—
N. N.	Medizinische Klinik Wenkebach	Malaria tertiana im Fieberanfalle, jedoch nicht kachektisch	—
Olga Kainrath	Karolinenkinderspital (Knöpfelmacher)	Sepsis bei einem 5jährigen Kinde	400
Frl. Sofka	Medizinische Klinik Ortner	Cavernöse Phthise andauernd hoch fiebernd	900
Hermine Redak	Medizinische Klinik Ortner	do.	300 (?)
Leopoldine Hausbeck	Medizinische Klinik Ortner	Lungentuberk. Psoas-Absceß, hoch fiebernd (39 bis 40°)	1400
Johann Schneeweiß	Allgemeine Poliklinik Abt. Mannaberg	Carcinoma oesophagi, gastrostomiert (Milchnahrung)	—
Leopoldine Haßlinger	Gynäkologische Klinik Wertheim	Puerperale Sepsis	250 (?)
			200 (?)
Zum Vergleiche: Normaler Mischharn (100 l) aus dem Jahre 1914 mit Toluolzusatz konserviert			(1500)

Nach Neuadjustierung der Bombe mit dem großen Platintiegel nebst dem ihn tragenden Kupferdraht an Stelle des kleinen Schälchens haben wir den Wasserwert neu ermittelt. Derselbe ergab in zwei Bestimmungen bei Verbrennung von Hippursäurepastillen beide Male genau denselben, nunmehr etwas höheren Wert: $W_b = 386$.

II.

Harnes bei Kachexien.

Stickstoffgehalt des nativen Harnes		N-Verlust bei der Aufbewahrung und Trocknung für 10 ccm Harn	Energiegehalt des nativen Harnes		Calorischer Quotient	Diazoquotient Vom Gesamt-N entfallen a. „Histidin"-N	Anmerkung
in 10 ccm	im Tagesharn		für 10 ccm Harn kleine Cal	für den Tagesharn große Cal	Cal./N	%	
0,0371	—	0,0042	528 547 } **538**	—	**14,50**	0,86	—
0,0656 0,0656 } 0,0656	—	0,0052	927 918 907 } **916**	—	**13,97**	0,63	Harn mit Katheter entnommen, jedoch eiweißfrei
0,0386 0,0375 } 0,0381	7,62	0,0018	419 408 } **413**	83	**10,84**	0,94	Harn eiweißfrei
0,0588 0,0580 } 0,0584	—	0,0002	753 759 } **756**	—	**12,95**	0,78	do.
0,0468 0,0468 } 0,0468	—	0,0016	487 477 } **482**	—	**10,29**	0,51	do.
0,1058 0,1084 } 0,1121	4,48	0,0073	1492 1479 } **1485**	59	**13,26**	0,85	do.
0,0880 0,0874 } 0,0877	7,89	—	1056 1006 } **1031**	93	**11,77**	0,69	do.
0,1770 0,1750 } 0,1760	5,28	0,0051	2072 2054 } **2063**	62	**11,72**	0,96	do.
0,0476 0,0468 } 0,0472	6,61	0,0042	523 502 } **512**	72	**10,85**	0,74	do.
0,2550 0,2490 } 0,2520	—	0,0070	2194 2160 } **2177**	—	**8,64**	0,38	do.
0,1538 0,1546 } 0,0542	3,85	0,0087	1740 1761 } **1750**	44	**11,35**	—	Harn mit Katheter entnommen, jedoch eiweißfrei
0,1584 0,1568 } 0,1572	3,14	0,0012	**1761**	32	**11,22**	—	
0,1090	(16,35)	—	873 875 } **874**	131	**8,02**	0,55	

III.

Brennwert des Harnes unterernährter und kachektischer Individuen.

Wir glauben, im Interesse der Kürze und Übersichtlichkeit der Darstellung, uns darauf beschränken zu dürfen, unsere Versuche in zwei Tabellen zusammenzufassen, von denen die

erste die Beobachtungen über chronische Unterernährung, die zweite diejenigen über Kachexien betrifft.

Die Tabelle I gibt über Art der Erkrankung bzw. des Körperzustandes, über Calorien und Stickstoffgehalt sowohl der Tagesnahrung als auch des Harnes, sowie über die N-Bilanz Auskunft (welche letztere in diesem Fall einfach als Differenz zwischen N-Gehalt der Nahrung und des Harnes unter Vernachlässigung der anderen Faktoren verstanden wird). Man ersieht ferner den calorischen Quotienten $\frac{\text{Cal}}{\text{N}}$ und die Angabe, wieviel Prozent von den Nahrungscalorien mit dem Harn ungenutzt verloren gegangen sind. Weitere Kolonnen enthalten das Wichtigste in bezug auf die jeweilige Versuchstechnik, insbesondere über die Reaktion des verarbeiteten Harnes, den N-Verlust bei Trocknung bzw. Aufbewahrung, den Verbrennungsmodus und die Vollständigkeit der Verbrennung.

In der Tabelle II fehlen die Daten über die Nahrungsaufnahme, dagegen enthält sie in einer Kolonne noch die Diazoquotienten, d. i. die Angabe, wie viele Prozente vom Gesamt-N auf das als Histidin berechnete und diesem offenbar nahestehende, der Oxyproteinsäurefraktion angehörige Imidazolderivat entfallen. Näheres über diesen Gegenstand findet sich in der vorausgehenden Abhandlung, die die Natur des Diazochromogens zum Gegenstande hat.

Wenn wir nun an die Beurteilung unserer Versuchsresultate herangehen, wäre es uns höchst erwünscht, wenn wir ganz genau und zuverlässig angeben könnten, innerhalb welcher Grenzen sich denn der Energiegehalt und calorische Quotient des normalen Harnes eines gesunden Menschen bei ausreichender, den Friedensverhältnissen entsprechender Ernährung mit gemischter Nahrung eigentlich bewegt. Es verbleiben aber darüber in der Literatur nur recht spärliche Daten, wenn man alles, was Tierversuche und einseitige Ernährung betrifft, ausgeschaltet hat. Wir werden den Normalwert des calorischen Quotienten bei Mischnahrung etwa mit 7,5 bis 9,5 bewerten können. Den Brennwert von je 10 ccm normalen Harnes von erwachsenen Menschen bewertet A. Loewy mit 600 bis 2000 cal. Der Energieverlust durch den Harn beträgt nach Rubner bei gemischter Kost $3^1/_2$ bis $4^1/_2$%[1]).

[1]) Vgl. A. Loewy, l. c. S. 1333 und 1338.

Die gegenwärtige Unmöglichkeit einer normalen Ernährung hat es uns nicht gestattet, selbst neue Standardzahlen zu ermitteln. Wir hatten jedoch noch von der Friedenszeit aus dem Jahre 1914 her einen großen Ballon mit 100 l normalen menschlichen Mischharnes, der durch Toluolzusatz konserviert worden war, aufbewahrt und den wir, da er seinen Stickstoffgehalt nicht verändert hatte und nicht stärker vergoren war, noch ganz gut für unsere Zwecke brauchen konnten. Für 10 ccm dieses Harnes betrug der Gesamt-N-Gehalt 0,1090 g[1]), der Energiegehalt 874 cal, woraus sich ein calorischer Quotient von 8,0 ergibt. Es stimmt dies gut mit dem von Benedict (s. o.) aus zahlreichen Versuchen an normalen Individuen gefundenen Mittelwerte von 8,09 überein[2]).

Was lehren uns nun zunächst unsere Versuche bei chronischer Unterernährung?

Alle unsere Harne waren abnorm arm an Stickstoff und Energie insofern ihr N-Gehalt (für 10 ccm gerechnet) nur 0,027 bis 0,080 g, ihr Energiegehalt nur 335 bis 814 cal betrug. Wenn A. Loewy die Zahl 600 cal als untere Grenze der Norm annimmt, so wird dieselbe nur in einigen wenigen Fällen überschritten. Die große Mehrzahl unserer Harne bleiben tief darunter (7 mal weniger als 450 cal).

Weiter ergibt sich, daß beim chronisch unterernährten Menschen der Organismus nicht etwa insofern sparsamer arbeitet, als weniger Energie mit dem Harn verloren geht; eher ist das Gegenteil der Fall. Wir fanden in unseren Fällen einen Energieverlust von 2,7 bis 10,8 %, während, wie gesagt, in der Norm 3 1/2 bis 4 1/2 % der mit der Nahrung aufgenommenen Energie mit dem Harn verloren gehen. Mehr als die Hälfte unserer Fälle lagen mit 4,6 bis 10,8 % oberhalb der oberen Grenze.

Was uns nun aber am meisten interessiert hat, war die Feststellung des calorischen Quotienten. Wenn wir vom Versuch Nr. 42 (calorischer Quotient = 7,5) absehen, der einen zwar eiweißarm, im übrigen aber mit mehr als 2500 Calorien ausreichend ernährten Universitätsprofessor betrifft, finden wir nur in einem einzigen Falle einen calorischen Quotienten

---

[1]) Es stimmt dies recht genau mit der von O. Folin (Amer. Journ. Physiol. 13, 45, 1905) bei der Analyse von 30 normalen menschlichen Harnen gefundenen Mittelzahl von 0,112.

[2]) F. G. Benedict, A Study of prolonged fasting. Washington 1915, S. 298.

unter 9,0. Alle anderen Fälle liegen mit ihren Quotienten 9,0 bis 13,3 entweder an der oberen Grenze der Norm oder aber erheblich darüber. Es liegt also zweifellos eine Tendenz zur Erhöhung des calorischen Quotienten vor, die ja allerdings nicht besonders imposant ist und die man auf die Zurückdrängung von Eiweiß und Fett in der Nahrung beziehen kann, insofern auch Tangl[1]) bei vorwiegender Kohlenhydraternährung Quotienten von 11,3 bis 13,2 beobachtet hat.

In noch ausgesprochenerer Weise tritt jedoch die Tendenz zur Erhöhung des calorischen Quotienten in den Kachexiefällen der Tabelle II zutage. Wenn wir von dem eine gleich zu erörternde Ausnahmsstellung einnehmenden Fall von Speiseröhrenkrebs (Schneeweiß) absehen, finden wir in allen Fällen eine ausgesprochene Erhöhung der calorischen Quotienten auf 10,29 bis 14,50. Die größten Werte fanden sich bei einem vorgeschrittenen Falle von Mastdarmkrebs (14,50), bei einem Falle von Sarkom mit Metastasen (13,97), bei einem im Zustande schwerer Kachexie befindlichen Falle von perniziöser Anämie (12,95) sowie bei einer Sepsis im Kindesalter (13,26).

Bei der Mehrzahl der Kachexiefälle war (vgl. die vorausgehende Arbeit) auch der „Diazoquotient" merklich der Norm gegenüber erhöht, was wir mit einer vermehrten Ausscheidung des Diazochromogens im Zusammenhange mit einer erhöhten Einschmelzung von Protoplasmaeiweiß in Zusammenhang gebracht haben.

Es ist, wie bereits in der genannten Arbeit näher ausgeführt worden ist, sehr lehrreich, daß in dem Falle von Ösophaguscarcinom (Schneeweiß) sowohl der calorische Quotient als der Diazoquotient ganz abnorm niedrig erscheinen. Wir deuten dies in dem Sinne, daß die Ausführung der Gastrostomie und ausgiebige Milchernährung des halbverhungerten Patienten die kachektische Einschmelzung des Organprotoplasmas zu einem zeitweiligen Stillstande gebracht hat.

---

[1]) l. c.

IV.

Beziehungen des calorischen Quotienten zur Oxyproteinsäurenausscheidung im Harne.

Wir haben uns nun weiter die Frage vorgelegt, ob wir für die Tendenz zur Erhöhung des calorischen Quotienten im Harne unterernährter und kachektischer Individuen vielleicht irgendeine plausible Erklärung zu geben imstande wären.

Von den recht vagen und unbestimmten Vorstellungen, mit denen bisher eine gelegentliche Deutung einer Erhöhung des calorischen Harnquotienten versucht worden ist, war schon in der Einleitung die Rede.

Wir haben unsere Aufmerksamkeit von vornherein zweierlei Bestandteilen des Harnes zugewandt: der Hippursäure und ihren Homologen einerseits, den Oxyproteinsäuren andererseits.

Wir haben (unter Zugrundelegung der genauen Brennwertanalysen von Emery und Benedict[1]) nun zunächst für die wichtigsten Typen stickstoffhaltiger Harnbestandteile, die in namhafteren Mengen im Harne vorkommen können, die calorischen Quotienten Cal/N berechnet[2]). Wir finden so für Harnstoff 5,42, Ammoniak 6,50[3]), Harnsäure 8,22, Kreatinin 13,41, Glykokoll 16,67, Alanin 27,98, Leucin 61,15, Hippursäure 72,38, Tyrosin 76,42.

In bezug auf eiweißartige Substanzen, die ja in mannigfacher Gestalt im Harne auftreten können, werden wir uns zum mindesten hinsichtlich der Größenordnung leicht orientieren können, wenn wir uns vergegenwärtigen, daß z. B. für Fleischeiweiß sich ein calorischer Quotient $\frac{5,778}{0,163} = 35,5$ für Ovalbumin $= \frac{5,735}{0,153} = 37,4$ berechnen läßt.

---

[1]) l. c.

[2]) Z. B. 1 g Harnsäure hat den Brennwert von 2,737 große Calorien und enthält 0,333 g N. Der calor. Quotient der Harnsäure ist sonach $\frac{2,737}{0,333} = 8,22$.

[3]) Vgl. A. Loewy, l. c. S. 1325.

Der außerordentlich hohe Quotient der Hippursäure springt in die Augen. Wir verstehen so ohne weiteres, warum Pflanzenfresserharne durch sehr hohe calorische Quotienten ausgezeichnet sind und daß auch für Menschen, wenn sie freiwillige oder unfreiwillige Vegetarianer geworden sind, ähnliches gelten kann.

Was nun aber weiterhin die Frage betrifft, ob nicht auch und vielleicht in erster Linie, die Oxyproteinsäuren an der Erhöhung des calorischen Quotienten beteiligt sein könnten, müssen wir zunächst wissen, wie denn der Brennwert der Oxyproteinsäuren beschaffen ist. Haben wir es hier mit Schlackenstoffen des Stoffwechsels zu tun, die (im Vergleiche zu anderen im Harne zur Ausscheidung gelangenden Endprodukten des Stoffwechsels, wie dem Harnstoff, dem Ammoniak, den Purinkörpern und dem Kreatinin) durch einen hohen calorischen Quotienten ausgezeichnet sind? Darüber fehlte bisher in der Literatur jede Andeutung. Doch schien uns dies mit Rücksicht auf die genetischen Beziehungen der Oxyproteinsäuren zu den Proteinen von vornherein nicht unwahrscheinlich.

Wir sind daher daran gegangen, zunächst den calorischen Quotienten der Oxyproteinsäuren aus normalem Menschenharn festzustellen.

Wie der eine von uns in einer früheren Abhandlung[1]) über ein vereinfachtes Verfahren zur Bestimmung der Oxyproteinsäurefraktion m Harne sowie in der vorstehenden Arbeit über die Diazochromogene des Harnes auseinandergesetzt hat, wurde seinerzeit (noch während der Friedenszeit) vermittels des Sojafermentverfahrens aus einer größeren Menge normalen menschlichen Mischharnes die „Barytfraktion" abgetrennt, d. i. die Fraktion alkohollöslicher Säuren, die wasserlösliche, edoch alkoholunlösliche Barytsalze geben und die ihrem Hauptanteile nach aus Oxyproteinsäuren besteht.

In je 5 ccm einer Lösung dieser „Barytfraktion" wurde der Gesamt-N nach Kjeldahl mit 0,0453 g bez. 0,0470 g, Mittel 0,0461 g ermittelt. Zwei weitere Proben zu 5 ccm wurden genau so, als ob es sich um Harn handeln würde, mit Kieselgur eingetrocknet und in der Bombe verbrannt, die Verbrennung, die glatt und ohne jeglichen Kohlenrückstand erfolgt war, ergab, bei genauer Übereinstimmnng der Parallelproben, einen Brennwert von 1750 bez. 1749 cal. Der calorische Quotient ergab sich sonach mit $\frac{1,7495}{0,0461} = 37,95$.

[1]) O. Fürth, diese Zeitschr. **69**, 448, 1915.

Ein weiterer Anteil der Lösung der „Barytfraktion“ wurde, zum Zwecke der Abscheidung der Oxyproteinsäuren, mit gesättigter Quecksilberacetatlösung unter Zusatz von Natronlauge bei schwach alkalischer Reaktion ausgefällt, der ausgewaschene Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, dieser mit einem Luftstrom beseitigt.

In dieser „Oxyproteinsäurefraktion“ ergab sich in 5 ccm 0,00868, bez. 0,00840, Mittel 0,00854 g Gesamt-N. Nach Eintrocknung mit Kieselgur ergab sich für je 20 ccm bei der Verbrennung (die diesmal mit Hinterlassung eines unwägbaren Kohlenanfluges erfolgt war) ein Brennwert von 893, bez. 894 cal. Der calorische Quotient betrug sonach (Umrechnung auf je 10 ccm der Fraktion) $\frac{0,4465}{0,0171} = 26,1$.

Wir haben weiterhin, unter Anwendung des (diese Zeitschr. **69**, 451 bis 453 eingehend beschriebenen) Sojafermentverfahrens auch aus einigen Harnen unterernährter und kachektischer Individuen die „Barytfraktionen“ abgetrennt und der calorimetrischen Verbrennung zugeführt. Dabei wurden je 500 ccm des Harnes mit 50 ccm einer frisch bereiteten Sojafermentlösung und 450 ccm Wasser zur Vergärung angesetzt. Die schließlich nach Durchführung des Verfahrens resultierende „Barytfraktion“ wurde auf 100 ccm aufgefüllt. Abgemessene Proben dienten zur Bestimmung des Gesamtstickstoffes und zur calorimetrischen Verbrennung:

Es ergab sich so für je 20 ccm der „Barytfraktionen“

Namen		Gesamt-N g		Brennwert cal		Cal. Quot. d. Barytfraktion
Marie Schmidt . . .	Chronische Unterernährung	0,0151 0,0151	0,0151	727 699	714	47,29
Frau Kolar	Chronische Unterernährung	0,0156 0,0178	0,0152	678 639	658	43,29
Frl. Cerletti	Apicitis	0,0244 0,0240	0,0240	1410 1358	1384	57,19
Joh. Leopoldseder . .	Rekonvaleszent nach Grippe	0,0152 0,0148	0,0150	571 649	610	40,66
Baumann	Sarkomkachexie	0,0146 0,0146	0,0146	751 773	762	52,19

Wir haben sonach den calorischen Quotienten der Barytfraktion für normalen menschlichen Mischharn mit 38, für die Harne Unterernährter und Kachektischer mit 40 bis 57 ermittelt.

Wir ersehen daraus, da der calorische Quotient des Harnstoffes nur 5,4, derjenige der anderen in größeren Mengen auftretenden Harnbestandteile (mit Ausnahme der Hippursäure) bei 6,5 bis 11,4 liegt, daß in der Tat jede das normale Maß überschreitende Ausscheidung von Oxyproteinsäuren

im Harne zu einer Erhöhung des calorischen Quotienten führen muß.

Nun wissen wir ja, daß überall dort, wo es unter dem Einfluß von Stoffwechselstörungen der verschiedensten Art zu einem vermehrten Zerfalle von Protoplasmaeiweiß kommt, eine vermehrte Ausscheidung von Schlackenstoffen aus der Gruppe der Oxyproteinsäuren beobachtet werden kann, es möge sich nun um fieberhafte Infektionskrankheiten, Tuberkulose, Kachexie infolge maligner Tumoren, um Vergiftungen, um Sauerstoffmangel od. dgl. handeln. In allen diesen Fällen kann sich die vermehrte Ausscheidung von Oxyproteinsäuren durch eine vermehrte Ausscheidung des Neutralschwefels verraten sowie unter Umständen auch, wie aus der voranstehenden Abhandlung zu ersehen ist, durch eine vermehrte Ausscheidung von Diazochromogenen, die zum Teile sicherlich mit dem Histidinkerne, zum Teile allerdings anscheinend auch mit anderen zyklischen Komplexen des Eiweißmoleküls zusammenhängen.

Wenn also beispielsweise Zuntz, Loewy, Müller und Caspari[1]) beim Aufstiege auf den Monte Rosa in einer Höhe von mehr als 4500 m gleichzeitig mit dem Bestehen mehr oder weniger intensiver Bergkrankheit einen Anstieg des calorischen Harnquotienten beobachtet haben, so liegt es unseres Erachtens nunmehr immerhin nahe, an eine vermehrte Ausscheidung von Oxyproteinsäuren zu denken.

Daß eine vermehrte Ausscheidung von Hippursäure und ihren Verwandten, dort wo eine solche tatsächlich nachweisbar ist, den calorischen Quotienten stark erhöhen muß, ist selbstverständlich; das gleiche gilt natürlicherweise auch für Zuckerarten, Glucuronsäure, β-Oxybuttersäure u. dgl. sowie auch für Eiweißkörper und Eiweißderivate. Die Analyse wird in jedem konkreten Falle darüber Auskunft geben müssen, ob eine vermehrte Ausscheidung derartiger Substanzen wirklich in Betracht kommt oder nicht.

Künftighin wird man aber überall dort, wo man den calorischen Harnquotienten erhöht findet, niemals die Oxyproteinsäuren vergessen dürfen, und sei

---

[1]) l. c.

es durch direkte quantitative Bestimmung derselben, sei es durch Ermittlung des neutralen Schwefels sich in dieser Hinsicht Klarheit verschaffen müssen. Daneben wird man auch die Ausscheidung freier Aminosäuren zu beachten haben.

Für den speziellen Fall der chronischen Unterernährung und der Kachexien sind darauf hinzielende systematische Untersuchungen in diesem Institute zur Zeit im Gange.

Zum Schlusse möchten wir bemerken, daß wir dem Vorstande des Physiologischen Institutes, Prof. A. Durig, zu besonderem Danke dafür verpflichtet sind, daß er nicht nur die konkreten Voraussetzungen für calorimetrische Untersuchungen in diesem Laboratorium geschaffen hat, sondern auch seine reichen praktischen Erfahrungen auf dem Gebiete der Calorimetrie uns jederzeit in liebenswürdigster Weise hat zugute kommen lassen.

Zusammenfassung.

1. In bezug auf die Technik der Harncalorimetrie haben sich einige Vereinfachungen und Modifikationen als zweckmäßig ergeben. Dieselben betreffen insbesondere das Eintrocknungsverfahren (kurzdauerndes Eindampfen am Wasserbade unter Kieselgurzusatz und darauf folgende Trocknung im Vakuum bei Zimmertemperatur), die Verbrennung des Harnrückstandes in einem geräumigen Platintiegel auf einer Unterlage von Kieselgur sowie die Zündvorrichtung und die Abmessung (statt Wägung) des Calorimeterwassers (nach Durig).

2. Die Feststellung des Brennwertes der Harne chronisch unterernährter Individuen ergab bei einem an sich niedrigen Stickstoff- und Energiegehalte (0,027 bis 0,080 g N und 335 bis 814 cal für je 10 ccm Harn) eine ausgesprochene Tendenz zur Erhöhung des calorischen Quotienten Cal/N Derselbe betrug in den untersuchten Fällen 9,0 bis 13,3 (gegenüber einer Norm von $7^1/_2$ bis $9^1/_2$). Eine sparsamere Arbeitsweise des unterernährten Organismus konnte keineswegs festgestellt werden, insofern 2,7 bis 10,8 % der mit der Nahrung aufgenommenen Energie mit dem Harne verloren gegangen sind (normal $3^1/_2$ bis $4^1/_2$ %).

3. In noch ausgesprochenerer Weise trat die Tendenz zu

einer Erhöhung des calorischen Quotienten bei der Untersuchung des Harnes bei kachektischen Krankheitszuständen verschiedener Art zutage. (Cal/N = 10,3 bis 14,5). Die höchsten calorischen Quotienten (12,3 bis 14,5) wurden bei den untersuchten Fällen von Mastdarmkrebs, metastasierendem Sarkom, perniziöser Anämie und Sepsis beobachtet.

4. Da es sich bei derartigen Fällen um einen fortschreitenden Zerfall von Organprotoplasma handelt, ein solcher aber erfahrungsgemäß mit einer Mehrausscheidung jener Schlackenstoffe des Stoffwechsels, die zur Gruppe der Oxyproteinsäuren gehören, einhergeht, liegt es nahe, die Erhöhung des calorischen Quotienten mit einer solchen in Zusammenhang zu bringen, insoweit dieselbe nicht etwa durch eine (mit der vorwiegend vegetabilischen Nahrung in Zusammenhang stehende) vermehrte Hippursäureausscheidung oder durch eine vermehrte Ausscheidung von Acetonkörpern u. dgl. bedingt ist.

5. Die Berechtigung einer solchen Annahme ergibt sich aus dem Umstande, daß der calorische Quotient der „Barytfraktion" aus normalem Friedensmischharne mit 38, aus Unterernährungs- und Kachexieharnen mit 40 bis 57 ermittelt worden ist. Derselbe übertrifft die calorischen Quotienten der anderen in größeren Mengen auftretenden stickstoffhaltigen Harnbestandteile (von der Hippursäure abgesehen) um ein Erhebliches, insofern der Quotient für Harnstoff nur 5,42, für Ammoniak 6,50, für Harnsäure 8,22, für Kreatinin 11,40 beträgt.

Einige jodometrische Untersuchungen.
Vorstudien zu einer Methode der Mikrobestimmung des Acetons.

Von

Malte Ljungdahl.

(Aus der Medizinischen Klinik der Universität Lund.)

(Eingegangen am 31. Mai 1919.)

Mit 11 Abbildungen im Text.

In einer in dieser Zeitschrift 83, Heft 1 und 2 erschienenen Arbeit „Zur Methodik der Acetonbestimmung" habe ich ein Verfahren mitgeteilt, das mit großer Ersparnis an Zeit und Reagenzien eine genaue Bestimmung des Acetons im Harn gestattet.

Wie bereits damals hervorgehoben wurde, hatten vorläufige Untersuchungen gezeigt, daß dieselbe Methodik sich sehr gut für Bestimmungen von so kleinen Acetonmengen, wie sie in etwa 100 mg Blut bei Diabetes vorhanden sind, eignet. Weitere Untersuchungen haben dies in allen Teilen bestätigt. Sie haben mich aber auch gelehrt, daß das Überdestillieren dieser kleinen Mengen überhaupt keine größeren Schwierigkeiten in sich birgt. Ich habe seitdem, einer Vereinfachung der Methodik nachstrebend, das Destillationsverfahren in mannigfacher Weise verändert und bin fast niemals auf nennenswerte Schwierigkeiten gestoßen. U. a. habe ich auch ein von Widmark angegebenes Verfahren benutzt und es bequem und genau gefunden.

Die Schwierigkeiten bei einer Mikromethode der Acetonbestimmung liegen darin, ohne Verluste des schnell verdampfenden, körperwarmen Acetons eine genaue Abmessung des Blutes zu erreichen. Dies ist Gegenstand der folgenden Abhandlung.

Nun gibt es aber bei diesen Bestimmungen auch Schwierigkeiten einer anderen Art; sie liegen in der Jodometrie selbst, indem die zu verarbeitenden verdünnten Lösungen den Einwirkungen verschiedenster Natur von Zeit, Wasser, Lauge und Säure ausgesetzt werden. Es ist wohl möglich, daß ich diese Schwierigkeiten verhältnismäßig groß gefunden habe, da ich aus verschiedenen Ursachen genötigt war, meine Arbeit in verschiedenen Laboratorien und auch sonst unter sehr ungleichen Verhältnissen durchzuführen. Doch glaube ich, daß jeder, der mit Bestimmungen dieser Art anfinge, manche Enttäuschungen und Überraschungen erleben würde.

Diese Schwierigkeiten hängen nicht von Fehlerquellen ab, die ihrer Natur nach unbekannt sind. Im Gegenteil sind die meisten schon Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Was aber nicht sehr allgemein bekannt sein kann, da man praktisch mit Bestimmungen dieser Art noch nicht viel gearbeitet hat, das ist die verschiedene Bedeutung, die den einzelnen Fehlerquellen gerade hier zukommt. Manche Faktoren, Beschaffenheit der Reagenzien, chemische Umwandlungen des alkalischen Jodgemisches, Menge und Konzentration der Titrierflüssigkeit usw. machen sich in einem verworrenen Spiel geltend, mitunter in akkumulierender Zusammenwirkung, mitunter einander gegenseitig ausgleichend, indem bei anscheinend bedeutungslosen Modifikationen in der Arbeitsweise die verschiedenen Faktoren mehr oder weniger zur Geltung kommen.

Die Fehlerquellen, auf die ich gestoßen bin, sowie auch was ich sonst während meiner Arbeit gefunden habe und was für die Mikromethode, die später beschrieben werden wird, von Bedeutung zu sein scheint, teile ich hier mit.

Herstellung und Aufbewahrung der Titrierflüssigkeiten.

Thiosulfatlösung.

Die Thiosulfatlösung wurde immer aus der käuflichen Substanz durch Abwägung hergestellt. Zur Einstellung der Lösung wurde eine entsprechende $^n/_{100}$- oder $^n/_{200}$-Jodlösung gebraucht, nach Bang (Blutzuckerbestimmung) bereitet: 10 bzw. 5 ccm $^n/_{10}$-HCl + 1 bis 2 ccm 2%ige KJO_3-Lösung + ca. 2 g JK + H_2O bis 100 ccm.

Eine Abnahme des Titers einer Thiosulfatlösung erfolgt nach Topf:

1. durch Kohlensäure (im Verein mit Sauerstoff),

2. durch direktes Sonnenlicht, wahrscheinlich aber nur durch die dabei stattfindende Erwärmung im Verein mit Sauerstoff und evtl. Spuren von Kohlensäure,

3. wahrscheinlich auch durch Organismen.

Von den Vorsichtsmaßregeln für die Aufbewahrung der Thiosulfatlösung, die Topf dabei abgeleitet hat, habe ich folgende angewandt:

1. Bereitung der Thiosulfatlösung mit möglichst reinem, ausgekochtem, also kohlensäurefreiem Wasser.

2. Luftzuführungsöffnung mit einem Kohlensäureabsorptionsrohr versehen.

3. Aufbewahrung an einem kühlen, vor direktem Sonnenlicht geschützten Ort.

Die Haltbarkeit einer ca. $^{n}/_{200}$-Thiosulfatlösung, in einer 500 ccm fassenden schwarzen Flasche aufbewahrt, die mit paraffiniertem Korkstopfen und einem die Luftzuführungsöffnung zuschließenden, Natronkalk enthaltenden Absorptionsrohr versehen ist, geht aus folgenden Zahlen hervor:

bereitet am 19. I. 1918	bereitet am 7. III. 1918
zeigt am 19. I. den Titer 1,025	zeigt am 7. III. den Titer 0,960
„ „ 13. II. „ „ 1,030	„ „ 26. III. „ „ 0,960
bereitet am 26. III. 1918	bereitet am 12. XI. 1918
zeigt am 26. III. den Titer 0,930	zeigt am 12. XI. den Titer 1,050
„ „ 13. IV. „ „ 0,930	„ „ 18. XII. „ „ 1,030

Wie diese verhalten sich zahlreiche andere auf ihre Haltbarkeit geprüfte Thiosulfatlösungen, d. h. unter den erwähnten Kautelen behielten sie ihren Titer etwa 6 Wochen lang, mitunter auch viel länger. Aber nicht immer. Mitunter war schon nach 3 Wochen der Titer um 5 bis 10% abgeschwächt. Eine am 11. III. bereitete und genau gegen eine $^{n}/_{200}$-Jodlösung eingestellte und in gesagter Weise aufbewahrte $^{n}/_{200}$-Thiosulfatlösung hatte schon am 2. IV. ihren Titer dermaßen verändert, daß 1 ccm nur 0,92 ccm Jod entsprach, hatte also um 8% abgenommen. Ein Teil der zur selben Zeit bereiteten, aber im Meßkolben im vollen Tageslicht aufbewahrten Thiosulfatlösung

hatte während derselben Zeit keine bemerkbare Abnahme ihres Titers erlitten. Noch am 20. IV., nach täglichem Gebrauch entsprach 1 ccm dieser im Meßkolben aufbewahrten Thiosulfatlösung 0,97 ccm Jod, war also nur um 3 % gesunken. Später habe ich dieses Verhalten, also eine bessere oder gleich gute Haltbarkeit des im Meßkolben aufbewahrten Thiosulfats gesehen, auch wenn es dem Tageslicht lange Zeit ausgesetzt war, mehrmals beobachten können. Im Laufe der Arbeit bin ich deshalb dazu übergegangen, die Thiosulfatlösung im Meßkolben aufzubewahren und die Bürette jedesmal daraus zu füllen. Auf ziemlich schnell entstehende Veränderungen der Thiosulfatlösung muß man jedenfalls bereit sein, ihr Titer ist also besonders nach wochenlangem Gebrauch, wenigstens täglich einzustellen.

Jodlösungen.

Im allgemeinen sind $^{n}/_{200}$-Lösungen bei den folgenden Untersuchungen gebraucht worden. Sie wurden aus einer, 20 gm Jodkalium auf 1 Liter enthaltenden Jodlösung von etwas größerer Konzentration als $^{n}/_{10}$ durch Verdünnung bereitet und mit der in eben beschriebener Weise hergestellten Thiosulfatlösung eingestellt. Sie wurden immer in mit Glaspfropfen geschlossenen Meßkolben aufbewahrt.

Wenn eine solche Lösung nicht gebraucht wird, hält sie ihren Titer Monate hindurch. Bei täglichem Gebrauch nur etwa eine oder zwei Wochen. Eine Jodlösung ca. $^{n}/_{200}$ am 9. XI. 1918 bereitet mit dem Titer 1,030; nach täglichem Gebrauch am 14. XI. 1,025, am 18. XII. 0,980. Eine andere, genau $^{n}/_{200}$-Jodlösung vom 5. X. 1918 ohne Gebrauch aufbewahrt, zeigt am 20. XI. denselben Titer; nach täglichem Gebrauch am 6. XII. ist sie noch unverändert, am 10. XII. hat der Titer aber um 3 % abgenommen, am 13. XII. um 5 %.

Wenn man nur dieses allmähliche Sinken des Titers berücksichtigt, läßt sich also eine Jodlösung wenigstens mehrere Wochen brauchen. Mitunter kam es mir allerdings vor, als gäben solche ältere Jodlösungen einen unschärferen Umschlag beim Titrieren mit Thiosulfat, als hätten sie eine größere Neigung zur Nachbläuung.

Über die Jodlösung wäre noch eins hinzuzufügen. Wenn

man eine solche Lösung in den ersten Minuten nach ihrer Bereitung bestimmt, bekommt man mitunter nicht unbeträchtliche Differenzen zwischen den verschiedenen Bestimmungen. Im Laufe etwa der ersten halben Stunde kann man dann sehr oft eine merkbare Abnahme des Titers konstatieren, ja noch nach mehreren Stunden kann mitunter ein unbedeutendes Sinken beobachtet werden. Ich habe mich deshalb daran gewöhnt, womöglich nur mit wenigstens 4 Stunden alten Lösungen zu arbeiten.

Die Lauge.

Das gewöhnliche Ätznatron (oder -kali) enthält so viele Verunreinigungen, daß es für Bestimmungen dieser Art ganz unbrauchbar ist. Auch das Präparat Natr. hydric. puriss. Merck ist nicht immer frei von jodverbrauchenden Zumischungen, die doch nur bei ziemlich großen Variationen der gebrauchten Mengen sich geltend machen. Den größten Verbrauch an Jod sah ich bei einem Präparat, wo 1 ccm ca. $^{n}/_{200}$-Jodlösung in 1 ccm der $^{n}/_{1}$-Lauge (+ 7 ccm H_2O) 1,020 ccm Thiosulfat entsprach, in 4 ccm Lauge (+ 4 ccm H_2O) 0,990 ccm Thiosulfat, in 8 ccm Lauge 0,955. Es ist somit nötig, immer mit bekannten, aus einer Bürette abgemessenen Quantitäten Lauge zu arbeiten.

Die Säure.

Gebraucht wurde immer eine $^{n}/_{1}$-Lösung der käuflichen Schwefelsäure. Es ist mir niemals zugestoßen, daß von hier aus Fehler in die Analysen eingeschlichen sind. Wenn 1 oder 20 ccm verwandt wurden, immer blieben die Resultate bei sonst gleichen Versuchsbedingungen dieselben.

Das Wasser.

Unter allen Faktoren, die bei Bestimmungen dieser Art mitwirken, spielt ohne Zweifel die Beschaffenheit des Wassers die größte Rolle. Eine Unreinheit des Wassers macht sich störend geltend bei Variationen sowohl der Jodmengen, der Wassermengen, und, was besonders hervorzuheben ist, bei Variationen der Zeit, in der ein alkalisches Jodgemisch vor der Titrierung aufbewahrt wird.

Im Laufe meiner Arbeit habe ich mit Wasser von fünf

verschiedenen Destillationsapparaten gearbeitet, die hier nach dem Grade ihrer Reinheit mit A, B, C, D und E bezeichnet werden.

1. Einfluß der Jodmenge. Wenn man verschiedene Mengen einer Jodlösung einem jodverbrauchenden Wasser zusetzt, steigt der Verbrauch des Jodes nicht entsprechend der Jodvermehrung, wird vielmehr absolut etwa derselbe, m. a. W. der Titer erscheint höher, je größer die Jodmenge ist. Eine Mischung, die 10 ccm Wasser D + 1 ccm $^1/_{200}$-Jodlösung + 1 ccm $^n/_1$-Lauge + 2 ccm $^n/_1$-Schwefelsäure enthielt, entsprach 0,93 einer Thiosulfatlösung, dieselbe Mischung aber mit 2 ccm der Jodlösung entsprach 1,94 ccm der Thiosulfatlösung (anstatt 1,86). Ein ähnlicher Versuch mit Wasser C ergab: 1 ccm Jod = 0,93 Thiosulfat, 2 ccm Jod = 1,92 Thiosulfat, mit Wasser A: 1 ccm Jod = 0,94, 2 ccm Jod = 1,89 Thiosulfat.

Es ist also ratsam, den Titer immer für die zu gebrauchende Jodquantität zu bestimmen, nicht aus einem bei einer anderen Jodquantität gefundenen Werte zu berechnen.

2. Einfluß der Wassermenge. Bei Variationen der Wassermengen fällt bei Gleichbleiben der zur Bestimmung verwandten Jodmengen natürlich der Titer mit steigenden Wasserquantitäten niedriger aus. Der Einfluß der Wassermengen geht aus folgenden Beispielen hervor (Fig. 1 bis 4). Die Titration wurde ausgeführt in einer Mischung von 1 ccm $^n/_1$-Lauge + 1 ccm etwa $^1/_{200}$-Jodlösung und Wasser in unten angegebener Menge, dann mit 2 ccm $^n/_1$-Schwefelsäure versetzt. Titrieren unmittelbar nach der Mischung.

Abnahme des Jodtiters

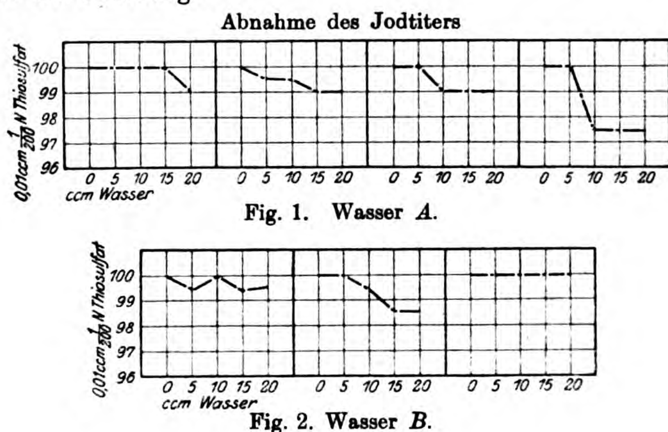


Fig. 1. Wasser *A*.

Fig. 2. Wasser *B*.

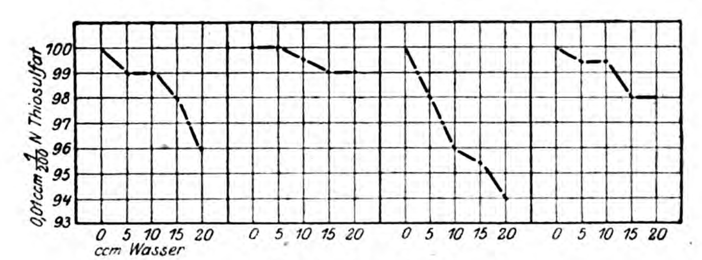


Fig. 3. Wasser *C.*

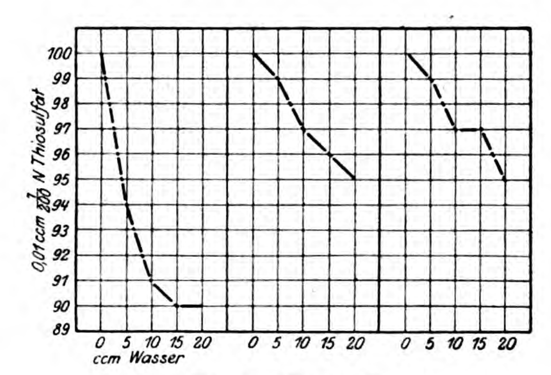


Fig. 4. Wasser *E.*

Mit Ausnahme des sehr schlechten Wassers E ist also die Titerabnahme im allgemeinen innerhalb der hier gezogenen Grenzen sehr gering. Es versteht sich ja von selbst, daß eine Jodstärkereaktion, die in einer kleinen Flüssigkeitsmenge eben noch wahrnehmbar ist, unzureichend sein kann, um eine wahrnehmbare Blaufärbung einer größeren Menge zu bewirken. Aber es spielt dies gewiß eine sehr geringe Rolle. Offenbar kommt die größte Bedeutung einer Unreinheit des Wassers zu. Das erhellt deutlich aus den vorgelegten Beispielen. Diese zeigen auch, daß die einzelnen Wasserportionen aus demselben Destillationsapparat bezüglich ihrer Reinheit sehr verschieden sein können. Immerhin ist zu betonen, daß die Schwankungen der Titerabnahme zwischen den einzelnen Proben desselben Wassers, nicht ausschließlich von der verschiedenen Reinheit dieser Proben herrühren. Sie dürften auch von der Zeit ab-

hängig sein, während der die Bestimmung ausgeführt wird. Je schneller gearbeitet wird, desto weniger tritt die Bedeutung der Unreinheit des Wassers hervor. Wenn man schnell arbeitet, kann auch ein sehr unreines Wasser als ein nur wenig Jod verbrauchendes erscheinen.

3. Einfluß der Zeit. Wenn man sich von der Reinheit eines Wassers überzeugen will, muß man also die abgemessene Jodquantität eine bestimmte Zeit auf das zu prüfende Wasser einwirken lassen. Offenbar braucht die Reaktion des Jods auf die Verunreinigungen des Wassers eine gewisse Zeit, ehe sie eine bemerkbare Titerabnahme bewirkt, was natürlich von größter Bedeutung für die Acetonbestimmung ist, wo das Jod, um einen völligen Übergang das Acetons in Jodoform zu gestatten, eine nicht geringe Zeit mit dem Wasser zu reagieren Gelegenheit hat.

Es seien hier einige Untersuchungsserien als Beispiele vom Einfluß der Zeit auf die von Verunreinigungen des Wassers verursachte Titerabnahme einer Jodlösung angeführt (Fig. 5 bis 11).

Überall sind 12 ccm des betr. Wassers gebraucht. Die einzelnen Proben enthalten außerdem 1 ccm $^{n}/_{1}$-Lauge, 1 ccm $^{n}/_{200}$-Jodlösung. Nach verschieden langem Dahinstehen ohne Umrührung wird mit 2 ccm $^{n}/_{1}$-Schwefelsäure sauergemacht und sofort titriert.

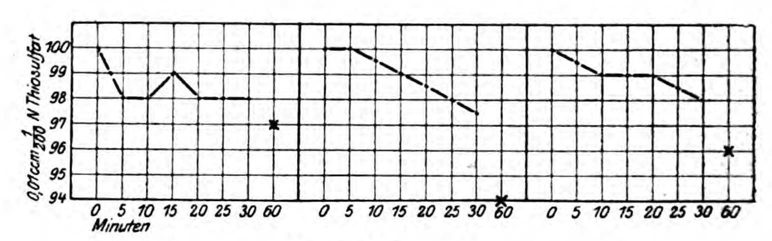


Fig. 5. Wasser *A*.

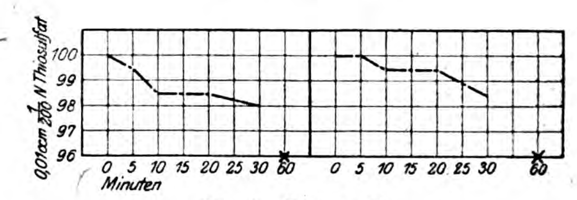


Fig. 6. Wasser *B*.

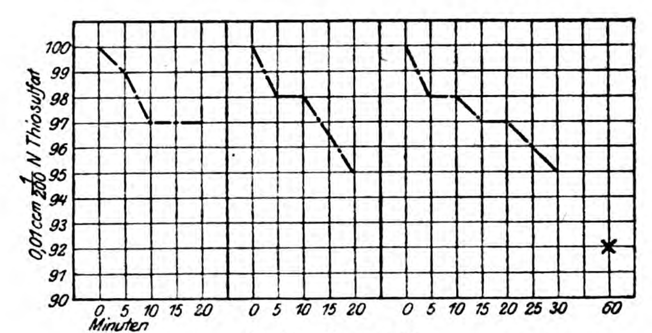


Fig. 7. Wasser *C*.

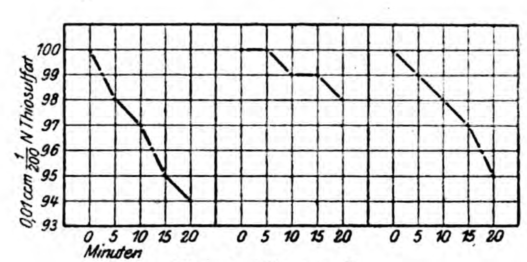


Fig. 8. Wasser *D*.

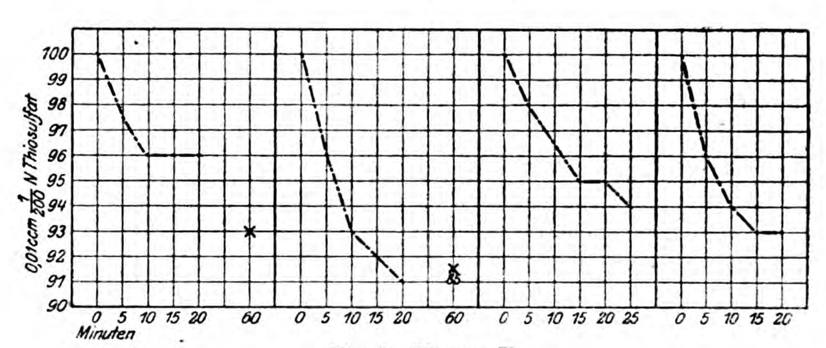


Fig. 9. Wasser *E*.

Aus diesen wenigen Beispielen erhellt mit aller Deutlichkeit der Einfluß der Zeit und des Wassers. In den Wässern der größten Reinheit beträgt die Abnahme des Titers höchstens 0,025 ccm in 20 Min. Erst nach einer Stunde wird die Abnahme deutlicher: 0,030 bis 0,045. In den unreineren Wässern ist die Abnahme des Titers schon in den ersten 20 Min. höchst beträchtlich. Der Unterschied zwischen den verschiedenen Wässern geht besonders aus Fig. 10 und 11 hervor.

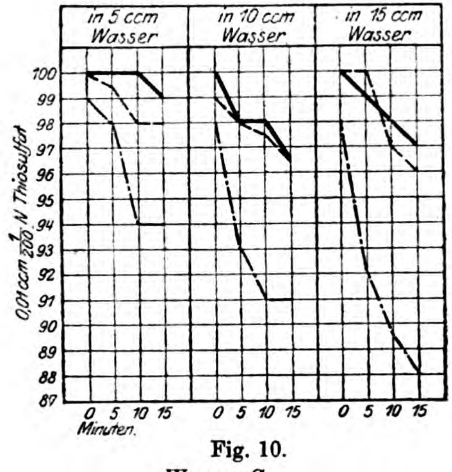


Fig. 10.
Wasser C ——
„ D - - - - -
„ E - · - · -

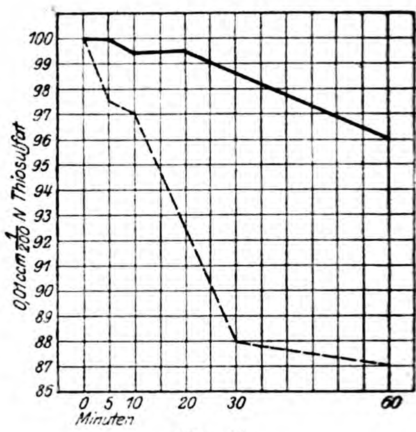


Fig. 11.
Wasser B ——
„ E - - - - -

Nun ist bei Hinstellen diese Abnahme des Titers des Jods in alkalischer Lösung nicht nur von Unreinheit des Wassers bedingt. Chemische Prozesse anderer Art sind auch wirksam, eine Titerabnahme kommt also bei genügend langem Dahinstehen auch in dem reinsten Wasser vor.

Man muß also, auch wenn man mit denkbar reinstem Wasser arbeitet, immer bei Beurteilung der Resultate auf die Zeitverhältnisse Rücksicht nehmen.

Wie aus den Tabellen hervorgeht, variiert der Grad der Abnahme nicht unbeträchtlich in den verschiedenen Versuchen, bei den Wässern unreinerer Art, bei Wasser E z. B., in den vorgelegten Versuchen zwischen 0,04—0,90. Der Unterschied hängt zum Teil mit der gerade bei solchen Wässern sehr oft zu beobachtenden Verschiedenheit der einzelnen Portionen bezüglich ihrer Reinheit zusammen. Es scheint aber, als ob noch andere Faktoren dabei wirksam wären. So können wahrscheinlich Temperaturverschiedenheiten, und zwar ziemlich geringfügige, eine solche Unregelmäßigkeit in dem Verhalten solcher Wässer bewirken.

4. **Einfluß der Temperatur.** In drei Serien von je 12 ccm derselben Portion Wasser $E + 1$ ccm $^{n}/_{1}$-Natronlauge $+ 1$ ccm $^{1}/_{200}$-Jod enthaltenden Proben, die 5 bis 20 Minuten

dahinstehen, ehe nach dem Zusatz von 2 ccm $^{n}/_{1}$-Schwefelsäure titriert wurde, wurden in der einen Serie die Proben bei einer Temperatur von 16°, in der anderen von 24°, in der dritten bei 55° C gehalten. Die Resultate gehen aus untenstehender Tabelle hervor.

	16°	24°	55°
0 Min.	0,99	0,985	0,98
7 „	0,94	0,94	0,925
15 „	0,93	0,90	0,885

Daß eine höhere Temperatur die Abnahme des Titers sehr beschleunigt, und zwar zum größten Teil durch eine Beförderung der Reaktion des Jods mit den Unreinigkeiten des Wassers, läßt sich am besten erblicken, wenn man ein alkalisches Jodgemisch kurz bis zum Kochen aufwärmt.

In zwei Serien war der Titer eines Jodgemischs (12 ccm Wasser *B* bzw. *E* + 1 ccm Lauge + 1 ccm Jod) nach verschieden langem Stehen, in ccm $^{1}/_{200}$-Thiosulfat angegeben:

	Wasser *B*	Wasser *E*
Nach 0 Minuten	1,045	1,040
„ 3 „	1,045	1,010
„ 10 „	1,040	0,990
„ 20 „	1,030	0,945
„ 30 „	1,020	0,945
„ 60 „	0,985	0,900

Wenn dasselbe Gemisch unmittelbar nach dem Bereiten und vor dem Ansäuern kurz aufgekocht und sofort abgekühlt wurde, war der Titer in

Wasser *B*	Wasser *E*
1,015	0,91

Man sieht also, daß eine Titerabnahme, die in der Kälte erst nach etwa $^{1}/_{2}$ bis 1 Stunde erreicht wird, bei Siedehitze sofort eintritt. In einem solchen aufgekochten und abgekühlten Gemisch hält sich dann der Titer ziemlich lange unverändert. Noch nach 30 Min. Stehen war der Titer eines solchen Gemisches (Wasser *B*) = 1,015, also ganz unverändert. Nach 50 Min. war der Titer bis 1,005 gesunken, nach 60 Min. bis 1,000, nach 24 Stunden war der Titer bis 0,84 heruntergegangen. Durch Aufkochen wird man also auch bei einem unreinen Wasser ziemlich unabhängig von der Zeit.

Bei diesem Vorgang ist aber darauf zu achten, daß man nur bis zum beginnenden Kochen aufwärmt. Erhitzt man längere Zeit, so steigert sich die Abnahme mit der Dauer des Kochens.

Über die Natur der Verunreinigungen der von mir untersuchten Wässer, die so störend auf das Arbeiten mit verdünnten Jodlösungen einwirken, habe ich keine Untersuchungen gemacht. Wahrscheinlich können sie sehr verschiedener Art sein. Nur so viel kann ich sagen, daß sie nicht durch $^1/_2$- bis 1 stündiges Kochen auszutreiben sind.

Die von mir untersuchten Wässer sind durch in verschiedener Weise angeordnete Destillation hergestellt: Wasser *E* ist ein gewöhnliches Kondenswasser, durch Abkühlen von Wasserdämpfen erhalten, die in den ein Dampfbad versehenden Rohren zirkulieren. Wasser *D* ist (in der Apotheke) in einem Destillationsapparat bereitet, dessen sämtliche Teile aus verzinntem Kupfer bestehen. Wasser *C* ist destilliertes Wasser, das mit Schwefelsäure und Permanganat mittels eines gewöhnlichen, aus einem Glaskolben und einem Liebig-Kühler bestehenden Apparat redestilliert worden ist. Wasser *B* ist mit einem Destillationsapparat erhalten von demselben Material wie Wasser *D*. Wasser *A* endlich ist gewöhnliches Wasser, das in einem Destillationsapparat aus Glas, mit allen Verbindungen aus Glas (also ohne Kork oder Gummiverbindungen) bereitet wird.

Daß besonders Gummi eine sehr verschlechternde Einwirkung auf ein Wasser, das zu jodometrischen Bestimmungen gebraucht werden soll, ausübt, ist bekannt, und muß ausdrücklich betont werden. Von den untenstehenden Tabellen weist die Tabelle I die Abnahme des Titers einer Jodlösung in 10 ccm Wasser *C*. Die Tabelle II zeigt die Abnahme in 10 ccm desselben Wassers, nachdem es gerade umdestilliert worden ist. Das abfließende Wasser war in die Vorlage durch ein Glasrohr geleitet worden, das mittels eines 5 ccm langen Gummischlauches mit dem Kühler verbunden war.

	I	II
Nach 0 Min.	1,00	1,00
„ 2 „	0,99	0,94
„ 4 „	0,99	0,93

	I	II
Nach 6 Min.	0,99	0,92
„ 10 „	0,975	0,92
„ 60 „	0,90	0,85

Im Vergleich mit Gummi ist Kork ein vorzügliches Verbindungsmaterial. Wenn ein Korkstopfen gut ausgewaschen ist oder einigemal, z. B. bei der Destillation eines Wassers, gebraucht worden ist, braucht man keine Störungen zu befürchten. Aus einem mit zwei großen Korkstopfen versehenen Destillationsapparat habe ich, wenn der Apparat nur ein oder zweimal gebraucht worden war, ein ebenso gutes Wasser bekommen wie aus einem nur aus Glas zusammengesetzten.

Abdunsten des Jods.

Beim Arbeiten mit verdünnten Jodlösungen ist es fast ebenso wichtig, immer auf das schnelle Abdunsten des Jodes wie auf die Beschaffenheit des Wassers Rücksicht zu nehmen. Wenn dies nicht geschieht, können sich bei verschiedenen Momenten in der Arbeit sehr große Fehler einschleichen.

Sicher geht schon beim Abpipettieren der Jodlösung für eine Bestimmung eine gewisse Menge verloren. So weit wie möglich muß deshalb beim Abmessen dasselbe Verfahren verwendet werden sowohl beim Füllen des Meßinstruments, sei es Pipette oder Bürette, wie auch beim Abtropfen des Jods. Am besten läßt man die Jodlösung längs der Wand einfließen oder die Mündung der Pipette, bzw. der Bürette die Wasserebene berühren. In dieser Weise sind die Fehler wenigstens konstant und bei Bestimmungen wie die fraglichen ohne Belang.

Viel wichtiger ist es, wenn man sich zum Abmessen der Bürette bedient, im Auge zu behalten, daß die oberste Schicht der Jodlösung in der Bürette sehr bald eine beträchtliche Abnahme ihres Jodgehalts erfährt. Beim Arbeiten mit einer 15 ccm fassenden Bürette fand ich z. B. einmal den Titer der letzten Portion gleich 0,78. Die ersten Bestimmungen gaben alle 1,000. Zwischen den ersten und den letzten Bestimmungen lag nur ein Zeitabschnitt von 22 Min.

Man muß sich also beim Arbeiten mit Bürette daran gewöhnen, die obersten Schichten der in der

Bürette enthaltenen Jodlösung niemals für die Bestimmung zu gebrauchen.

Es gibt aber noch andere Momente im Laufe der Bestimmung, wo man sich des Abdunstens des Jods erinnern muß. Wenn die abgemessene Jodquantität zu einer Quantität Wasser in offenem Gefäß gesetzt wird, läßt sich sehr bald eine Abnahme der Jodmenge konstatieren.

1 ccm einer $^1/_{200}$-Jodlösung in 10 ccm Wasser *C* (in Spitzglas) entspricht an Thiosulfat 1/200:

nach 0 Min.	1,00
„ 3 „	0,975
„ 6 „	0,90
„ 15 „	0,86
„ 20 „	0,84

Es ist also diese Titerabnahme ungemein viel größer, als sie jemals in einem alkalischen Gemisch während derselben Zeit beobachtet wurde. Daß diese schnelle Verminderung des Jodtiters in rein wäßrigen Lösungen nicht auf eine schnellere Reaktion des Jods mit den Unreinigkeiten des Wassers beruht, sondern wahrscheinlich durch Abdampfen des Jods verursacht wird, geht daraus hervor, daß die Abnahme etwa gleich groß ist in Wässern sehr verschiedener Reinheit. 1 ccm $^1/_{200}$-Jod in 10 ccm Wasser *A* bzw. *D* entspricht an Thiosulfat:

	Wasser *A*	Wasser *D*
Nach 0 Min.	1,00	1,00
„ 3 „	0,97	0,965
„ 7 „	0,94	0,94
„ 12 „	0,925	0,92
„ 18 „	0,91	0,91

Da außerdem die Abdunstung sehr verschieden wird je nach der Menge und der Oberflächengröße des Wassers, ist es ersichtlich, daß man leicht unbehaglichen Überraschungen ausgesetzt wird, wenn dieses Verhältnis nicht gebührend berücksichtigt wird. Man hat z. B. eine Reihe von 5 Proben. Das Wasser (hier 15 ccm) ist zugesetzt. Dann wird zu jeder Probe 1 ccm der Jodlösung (hier vom Titer = 0,92 $^n/_{200}$-Th.) gebracht mit Nr. 1 anfangend. Wenn nun beim Titrieren die entgegengesetzte Ordnung befolgt wird, indem man mit Nr. 5 anfängt, werden die Resultate folgende.

1. — 0,86
2. — 0,88
3. — 0,89
4. — 0,90
5. — 0,92

Die ganze Serie beanspruchte etwa 10 Min. Ungemein viel langsamer geschieht die Abnahme in einem alkalischen Gemisch. Wenn dieselben Proben mit je 1 ccm $^{n}/_{1}$-Lauge versetzt wurden und dann erst die abgemessene Jodlösung eingebracht ward, fielen die Resultate bei derselben Arbeitsordnung in folgender Weise aus:

1. — 0,91
2. — 0,91
3. — 0,92
4. — 0,91
5. — 0,92

Es ist deshalb rätlich, daß man bei Serienversuchen immer in der Weise arbeitet, daß die Jodlösung erst nach der Lauge zugesetzt wird.

Nicht weniger schnell geschieht die Abdampfung des Jodes nach dem Ansäuern. Ein Gemisch von 15 ccm H_2O + 1 ccm $^{n}/_{1}$-Lauge + 1 ccm Jodlösung + 2 ccm $^{n}/_{1}$-Säure verbraucht unten angegebene Mengen einer $^{n}/_{200}$-Thiosulfatlösung:

	I		II		III	
Nach	0 Min.	— 0,99	0 Min.	— 1,345	0 Min.	— 1,020
„	2 „	— 0,98	1 „	— 1,355	2 „	— 0,995
„	5 „	— 0,95	3 „	— 1,310	5 „	— 0,990
„	8 „	— 0,89	5 „	— 1,280	10 „	— 0,975
„	14 „	— 0,88	10 „	— 1,240	16 „	— 0,930
„	30 „	— 0,79	15 „	— 1,180	25 „	— 0,930

Hieraus ergibt sich die wichtige Regel, daß man die alkalische Jodlösung erst kurz vor dem Titrieren ansäuert.

Faktoren, die die Jodstärkereaktion beeinflussen.

Bekanntlich ist die Empfindlichkeit der Jodstärkereaktion abhängig von Menge und Ionenkonzentration der Flüssigkeit.

Eine sehr große Bedeutung hat die Menge, wenn man in reinem Wasser titriert. 1 ccm $^{1}/_{200}$-Jodlösung entspricht z. B.

in	3 ccm	Wasser	0,99 ccm	Thiosulfat
„	5 „	„	0,99 „	„
„	10 „	„	0,95 „	„
„	15 „	„	0,90 „	„
„	20 „	„	0,89 „	„

Beim Titrieren in reinem Wasser macht sich aber eine Nachbläuung so störend geltend, daß sie eine genaue Bestimmung fast unmöglich macht. Hier ist der Thiosulfatverbrauch nach 5 Minuten Nachbläuung mit eingerechnet.

Wenn dieselben Proben aber 1 ccm $^n/_1$-Lauge und 2 ccm $^n/_1$-Säure enthalten, wird der Thiosulfatgebrauch

in	3 ccm	0,99
„	5 „	1,00
„	15 „	0,99
„	20 „	0,98

In derselben Richtung wirkt eine Konzentrationserhöhung, die erhalten wird, wenn anstatt (wie oben) einer wäßrigen Stärkelösung, eine solche in 20% KaCl, wie sie von Bang vorgeschlagen worden ist, verwendet wird. Die Werte werden dann

in	3 ccm	0,99
„	3 „	0,99
„	15 „	0,965
„	20 „	0,96

Es geht dies noch besser hervor, wenn man bestimmt, wieviel von einer $^1/_{200}$-Jodlösung gebraucht wird, um die geringste, eben empfindbare Blaufärbung in verschieden großen Wassermengen zu erhalten. Es wurde für je 5 ccm H_2O ein Tropfen der betreffenden Stärkelösung zugesetzt:

Wasser	Stärkelösung ohne KaCl. Gebraucht zu Blaufärbung $^n/_{200}$-Jod	Stärkelösung in 20% KaCl. Gebraucht zu Blaufärbung $^n/_{200}$-Jod	Wasser mit 1 ccm $^n/_1$-Lauge + 2 ccm $^n/_1$-Säure versetzt. Gebraucht zu Blaufärbung $^n/_{200}$-Jod
ccm	ccm	ccm	ccm
3	0,010	Sp.	Sp.
6	0,030	0,01	Sp.
10	0,040	0,035	0,020
12	0,060	0,020	0,020
15	0,070	0,030	0,030
20	0,090	0,040	0,030

Es folgt hieraus, daß es, wenn man in reinem Wasser titriert und sich einer ein Salz enthaltenden Stärkelösung bedient, gar nicht gleichgültig ist, ob man einen oder mehrere Tropfen der Stärkelösung der Titrierflüssigkeit zufügt. Aber auch nur beim Titrieren in reinem Wasser. Hat die Titrierflüssigkeit bereits eine gewisse Konzentration einer dissoziablen Substanz, so spielt eine weitere Erhöhung der Konzentration keine Rolle. Der Grad der Konzentration, bei der das Maximum der Empfindlichkeit eintritt, geht aus folgender Tabelle hervor. Alle Proben hatten eine Totalmenge von 20 ccm. Die aufgeführten Quantitäten $^n/_{200}$-Jodlösung geben die Mengen an, bei denen eine Blaufärbung eben wahrnehmbar war.

Titrierflüssigkeit insgesamt 20 ccm enthält von der betreffenden		Blaufärbung bei Verwendung von			
		$^n/_{200}$-Lauge und -Säure	$^n/_{100}$-Lauge und -Säure	$^n/_{10}$-Lauge und -Säure	$^n/_1$-Lauge und -Säure
Lauge ccm	Säure ccm	$^n/_{200}$-Jod ccm	$^n/_{200}$-Jod ccm	$^n/_{200}$-Jod ccm	$^n/_{200}$-Jod ccm
1	2	0,090	0,080	0,065	0,030
2	3	0,090	0,080	0,055	0,030
3	4	0,090	0,070	0,050	0,030
5	6	0,080	0,070	0,040	0,030
9	10	0,070	0,070	0,030	0,030

Bei einer Totalmenge von 20 ccm bekommt also die Jodstärkereaktion ihr Maximum, wenn die Konzentration einer $^n/_{20}$-Natriumsulfatlösung erreicht ist. Bei höherer Konzentration wird der Ausschlag unverändert. Bei dieser Konzentration wird die Titration nicht durch Nachbläuung gestört.

Es wäre nun möglich, daß der Grad der Ansäuerung die Titrierwerte beeinflussen könnte, daß also eine größere Säuremenge eine geringere Menge der zur Blaufärbung erforderlichen Jodquantität bewirken könnte. In der Tat sieht man auch beim Titrieren in reinem Wasser, daß der Zusatz von Säure einen solchen Effekt hat.

Zur Blaufärbung bedarf es in

20 ccm Wasser	20 ccm $^n/_{200}$-Säure	20 ccm $^n/_{100}$-Säure	20 ccm $^n/_{10}$-Säure	20 ccm $^n/_2$-Säure
0,100	0,070	0,070	0,040	0,030

Wenn aber die Titrierflüssigkeit bereits die genügende Salzkonzentration besitzt, hat ein gesteigerter Säurezusatz nicht diese Wirkung. Es wurden in den folgenden Proben bei in der Tabelle angegebener Variation der Alkali- und Säuremengen (N-Lösungen) in einer Totalquantität von 20 ccm von der $^{n}/_{200}$-Jodlösung zur Blaufärbung gebraucht:

Titrierflüssigkeit ccm	Lauge ccm	Säure ccm	Jod	Lauge ccm	Säure ccm	Jod
20	1	$1^1/_2$	0,030	1	10	0,040
20	2	$2^1/_2$	0,040	3	17	0,020
20	3	$3^1/_2$	0,030	5	15	0,020
20	4	$4^1/_2$	0,020	8	12	0,020
20	5	$5^1/_2$	0,020	9	11	0,030

Aus diesen Versuchen geht also hervor, daß man immer dafür Sorge tragen muß, daß die Titrierflüssigkeit eine hinreichende Salzkonzentration hat. Innerhalb der Grenzen von 1 bis 20 ccm genügt eine Quantität von 1 ccm $^{n}/_{1}$-Lauge + 2 ccm $^{n}/_{1}$-Säure.

Natürlich ist es, auch wenn diese Konzentration innegehalten wird, nicht ganz gleichgültig, ob man in 1 oder 20 ccm titriert. Aus rein optischen Gründen muß sich ein bestimmter Grad der Jodstärkereaktion stärker in 1 ccm als in 20 ccm geltend machen. Man braucht z. B. zu eintretender Blaufärbung in 1 ccm Lauge + 2 ccm Säure nichtmeßbare Spuren einer $^{1}/_{200}$-Jodlösung, wenn aber 17 ccm H_2O zugesetzt wird, bedarf es 0,03 bis 0,04 ccm.

Praktisch ist dies aber belanglos, da man ja niemals mit so variablen Flüssigkeitsmengen zu laborieren braucht, welches Destillationsverfahren man auch wählt.

Bedeutung des Jodkalis für die Jodstärkereaktion.

Die Bedeutung des Jodkalis für die Jodstärkereaktion erhellt aus einem Vergleich zwischen den Mengen Jod, die nötig sind, um eine Blaufärbung einer mit Stärke versetzten Wassermenge zu bewirken bei bzw. ohne Jodkalizusatz.

Wasser	Zur Blaufärbung nötige Mengen $^{1}/_{200}$-Jodlösung:		
	Jodlösung ohne KJ	Jodlösung mit 2 % KJ	Jodlösung mit 4 % KJ
ccm	ccm	ccm	ccm
1	Sp.	Sp.	Sp.
2	0,01	Sp.	Sp.
3	0,02	Sp.	Sp.
5	0,05	0,01	Sp.
10	0,06	0,02	0,02
20	0,10	0,03	0,03

Es tritt also eine Blaufärbung mit viel geringeren Jodmengen ein, wenn KJ zugesetzt wird. In derselben Richtung wirken, wie bereits gezeigt worden ist, auch andere Salze, aber nicht so kräftig wie das Jodkalium.

20 ccm Wasser gebrauchen von einer $^{n}/_{200}$-Jodlösung zur Blaufärbung

bei Gegenwart von 5 % KJ	$^{1}/_{200}$-Jodlösung	bei Gegenwart von 5 % NaCl	$^{1}/_{200}$-Jodlösung
ccm	ccm	ccm	ccm
0,05	Sp.	0,05	0,04
0,10	Sp.	0,10	0,04
0,30	Sp.	0,30	0,04
0,50	Sp.	0,50	0,03
1,00	Sp.	1,00	0,03

Das Jodkalium treibt folglich die Jodstärkereaktion ad maximum bei viel geringerer Konzentration als andere Salze; auch eine Salzkonzentration von $^{n}/_{20}$ bis $^{n}/_{10}$ wirkt nicht so kräftig, wie geringe Mengen Jodkalium.

17 ccm H_2O + 1 ccm $^{n}/_{1}$-Lauge + 2 ccm $^{n}/_{1}$-Säure gebraucht von einer $^{n}/_{200}$-Jodlösung zur Blaufärbung

bei Gegenwart von 5 % JK ccm	$^{1}/_{200}$-Jodlösung	bei Gegenwart von 5 % NaCl ccm	$^{1}/_{200}$-Jodlösung
0,05	Sp.	0,05	0,03
0,10	Sp.	0,10	0,01
0,30	Sp.	0,30	0,01
0,50	Sp.	0,50	0,02
1,00	Sp.	1,00	0,01

Diese ungemein größere Beförderung des Jodkalis auf die Jodstärkereaktion geht auch aus folgenden Bestimmungen hervor:

1 ccm einer etwa $^{n}/_{200}$-Jodlösung entspricht der $^{n}/_{200}$-Thiosulfatlösung

	mit 10 Tropfen 5 % NaCl	mit 10 Tropfen 5 % JK
5 ccm H_2O . .	1,045 ccm	1,065 ccm
10 „ „ . .	1,035 „	1,065 „
20 „ „ . .	0,985 „	1,060 „
30 „ „ . .	0,965 „	1,025 „

In sämtlichen der mit NaCl versetzten Proben trat sehr bald eine Blaufärbung ein. Wenn diese Blaufärbung nach 5 Minuten durch weiteren Zusatz von Thiosulfat zum Verschwinden gebracht wurde, kam ich zu folgenden Werten:

in	5 ccm	1,060
„	10 „	1,060
„	20 „	1,015
„	30 „	0,985

Nach weiteren 10 Minuten trat eine kräftige Blaufärbung wieder in den letzten zwei Proben auf.

In den mit Jodkali versetzten Proben trat dagegen eine Nachbläuung nur in der letzten Probe auf, und zwar schon in den ersten zwei Minuten. Gebraucht wurde jetzt 0,03 ccm des Thiosulfats, d. h. es wurde der richtige Titer erreicht.

Also liegt die besondere Bedeutung des Jodkalis zum Teil darin, daß es die Jodstärkereaktion beschleunigt oder auf die chemische Reaktion des Thiosulfats mit Jod in der Weise einwirkt, daß der endgültige Gleichgewichtszustand viel schneller erreicht wird als sonst.

Dieses Phänomen läßt sich nicht nur in reinem Wasser beobachten, sondern auch wenn man auf eine angesäuerte alkalische Jodlösung (also salzhaltige) titriert. Wenn man gleich vor dem endgültigen Umschlag, also wenn nur Spuren von Blaufärbung vorhanden sind, einige Tropfen einer Jodkalilösung zusetzt, wird das Gemisch sofort viel deutlicher blau.

Zusammenfassend läßt sich also von der Einwirkung des Jodkalis auf die Jodstärkereaktion beim Titrieren mit verdünnter Jodlösung sagen, daß es, wenigstens bei Mengen von 20 bis 30 ccm, eine Erhöhung des Titers bewirkt, ferner die Reaktion schärfer und schneller macht, und, was besonders wichtig ist, daß Differenzen in dem Jodtiter bei Verwendung verschieden großer Flüssigkeitsmengen bei Jodkalium viel weniger als sonst hervortreten, ja so gering werden, daß sie wenigstens in einer Breite von 10 bis 30 ccm Titrierflüssigkeit praktisch bedeutungslos werden.

Eine Mikromethode zur Bestimmung des Total-Acetons im Blute.

Von

Malte Ljungdahl.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut und der Medizinischen Klinik der Universität Lund.)

(Eingegangen am 31. Mai 1919.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Im Sommer 1916 schlug mir mein jetzt verstorbener Lehrer und Freund Prof. Ivar Bang vor, mit ihm eine Methode zur Mikrobestimmung des Acetons auszuarbeiten. In Anlehnung an von Bang bereits seit langem gehegte Pläne, die β-Oxybuttersäure durch Zerlegung auf oxydativem Wege zu bestimmen, versuchten wir das Aceton mit Chrom und Schwefelsäure zu spalten. Es zeigte sich dann aber, daß der Grad der Oxydation von so vielen Faktoren abhängig war, daß die Spaltungsprodukte bei kaum zu vermeidenden Variationen der Temperatur usw. so verschieden wurden, daß es uns hoffnungslos erschien, eine genaue Methode auf das oxydative Verfahren zu bauen. Als Bang sich dann aus verschiedenen Ursachen von der Arbeit zurückzog, setzte ich allein die Untersuchungen fort und ging dabei zu dem alten Prinzip, das Aceton in Jodoform zu überführen, zurück.

Wie ich bereits in meiner vorigen Arbeit angedeutet habe, hatte ich nämlich beim Ausarbeiten einer vereinfachten Methodik für die Acetonbestimmung im Harn[1]) konstatieren können, daß dieselbe Methodik sich auch für eine Mikrobestimmung sehr gut

---

[1]) Diese Zschr. **83**, 103.

eignete. Meine späteren Untersuchungen haben dies völlig bestätigt. Mit dieser Methode lassen sich einige 0,001 mg Aceton vorzüglich bestimmen. Meine in der vorigen Arbeit niedergelegten vorbereitenden Untersuchungen haben mich aber auch gelehrt, daß man die Methodik ohne Vernachlässigung der Genauigkeit noch mehr vereinfachen kann.

Beim Ausarbeiten der unten beschriebenen Mikromethode hat mir das Finden einer Technik, die eine genaue Abmessung der acetonhaltigen Flüssigkeit ohne Verlust des schnell verdampfenden Acetons gestatte, die größten Schwierigkeiten bereitet. Die größten Fehler aber, die sich in meine Bestimmungen eingeschlichen haben, rühren von der Jodometrie selbst her, nicht soviel aus Unbekanntschaft mit den der Jodometrie anhängenden Fehlerquellen, wie aus fehlerhaftem Einschätzen der Bedeutung dieser Fehler. Was ich auf diesem Wege gefunden habe, ist in der vorigen Arbeit dargelegt. Dagegen hat mir das Überdestillieren des Acetons keine größeren Schwierigkeiten bereitet, trotzdem ich das Destillationsverfahren im Laufe der Arbeit in mannigfacher Weise verändert habe.

Das Ziel, das ich mir mit dieser Methode gestellt habe, ist einem eventuellen Übergang der β-Oxybuttersäure des Blutes in Acetessigsäure nachzuforschen. Das abgemessene Blut muß deshalb eine gewisse Zeit unverändert aufbewahrt werden können. Die von Widmark veröffentlichte Mikromethode[1]), die nach den neuen Modifikationen eine hinreichende Genauigkeit zu besitzen scheint und außerdem sehr einfach ist, eignet sich für solche Untersuchungen nicht, da das Blut gerade nach der Abmessung, die hier mittels Abpipettierung geschieht, in den Destillationskolben eingeführt werden muß.

Beschreibung der Mikromethode.

Prinzip. Das bei einem einfachen Einstich in die Fingerkuppe oder in die Ohrenmuschel ausquellende Blut wird in ein Capillarrohr (durch die Capillarkraft) aufgezogen, das Capillar in ein Destillationssystem eingefügt und vor der Destillation in den Destillationskolben eingespritzt. Bei der

[1]) Acetonkonzentrationen i blod, urin och alveolärluft, Lund 1917.

Destillation entweicht das Aceton durch dasselbe Capillar und wird in eine Jod und Lauge enthaltende Vorlage ohne Kühlung aufgenommen. Dadurch wird die Flüssigkeit der Vorlage bis zum Kochen aufgewärmt, wobei eine maximale Jodoformbildung augenblicklich eintritt. In gewöhnlicher Weise wird dann das überschüssige Jod mit Thiosulfat titriert und berechnet.

Erforderliche Lösungen.

1. $^{n}/_{200}$-Jodlösung.

2. $^{n}/_{200}$-Thiosulfatlösung.

3. Stärkelösung 1 $^{0}/_{0}$, bereitet durch Auflösung von 1 mg wasserlöslicher Stärke (Merck) in destilliertem Wasser unter geringer Aufwärmung; nachher filtriert. Die Stärkelösung darf keine sichtbare Körnung zeigen und muß ganz wasserklar erscheinen.

4. $^{n}/_{1}$-Natronlauge, aus natr. hydric. puriss. Merck und ausgekochtem (also kohlensäurefreiem) Wasser bereitet.

5. $^{n}/_{1}$-Schwefelsäure.

6. Uranylacetatlösung: 300 ccm H_2O + 2 ccm HCl 25 $^{0}/_{0}$ bis zum Sieden aufgewärmt, dann werden 4 g Uranacetat + 1 g Kupfersulfat zugesetzt und gelöst; filtrieren. Das Filtrat wird mit 1300 ccm gesättigter (und filtrierter) KCl-Lösung gemischt und mit Wasser bis 2000 verdünnt.

Geräte.

1. 50 ccm Erlenmeyerkolben als Destillationskolben.

2. 25 ccm Erlenmeyerkolben als Vorlage.

3. Korkstopfen, am besten zylindrisch, jedenfalls nur wenig konisch, möglichst ohne Risse.

Der Korkstopfen hat zwei konische Durchbohrungen, die am besten mit einer aufgehitzten spitzen Pfrieme gemacht werden, und zwar wird von diesen Durchbohrungen die eine von unten nach oben (zum Aufnehmen der Ampulle des Capillarröhrchens), die andere von oben nach unten (für den Glaspfropfen) gemacht. Beide Durchbohrungen am besten etwas exzentrisch. Mittels eines gewöhnlichen Korkbohrers wird auf der oberen Fläche des Korkpfropfens um die Mündung der ersten der beiden Durchbohrungen, also die mit der Spitze nach oben gerichtete,

ein etwa $^1/_2$ cm tiefer zirkelförmiger Einschnitt gemacht (zum Festsetzen der Destillationsröhre). Siehe Fig. 1.

Die Korkstopfen sind einmal aufzukochen, ehe sie gebraucht werden können.

4. Eine Spritze, z. B. eine gewöhnliche Ohrspritze aus Glas (etwa 10 bis 15 ccm Inhalt).

5. Pfriemenartig ausgezogene Glasstäbchen, im folgenden „Glaspfröpfe“ genannt.

6. Möglichst dünnwandige Glasröhre, etwa von dem Umfang eines gewöhnlichen Bleistifts (äußerer Umfang 2,5 bis 2,8 cm).

Aus diesen Glasröhren werden dann gezogen:

A. Die Capillarröhrchen.

B. Die Destillationsröhren.

A. Die Capillarröhrchen bereitet man sich selbst nach einiger Übung sehr leicht und geschwind aus den genannten Glasröhren. Das Glasrohr wird zuerst bei stetiger Umdrehung in der Flamme eines kräftigen Bunsenbrenners aufgehitzt und dann bis zur Weite einer Stricknadel ausgezogen und in der Mitte der ausgezogenen Partie abgeschnitten. Wenn man eine genügende Anzahl solcher ausgezogener Stücke hat, wird jedes Stück an der Stelle, wo das dickere Glasrohr in die schmälere, ausgezogene Partie übergeht, in sehr kleiner Breite, ebenfalls bei lebhafter Umdrehung, stark aufgehitzt und zur Dicke etwa einer Stopfnadel ausgezogen, wobei eine nach beiden Seiten sich verschmälernde ampullenartige Auftreibung gebildet werden muß. Das Rohr wird dann gebogen und so abgeschnitten, daß es die Form, die in Fig. 2 (Größe $\frac{1}{1,5}$) wiedergegeben ist, bekommt. Das ampulläre Ende wird so lang gemacht, daß, wenn das Capillarröhrchen in den Korkstopfen fest eingesteckt ist, die Mündung 5 bis 10 mm oberhalb der Oberfläche des Korkstopfens reicht. Ein solches Röhrchen kann in jeder beliebigen Weise gedreht werden, ohne daß ein Abfließen des Blutes zu befürchten ist.

Fig. 1.



Fig. 2.

Die Capillarröhrchen wiegen 250 bis 400 mg und nehmen leicht 100 bis 150 mg Blut auf.

Einige Dutzend solcher Capillarröhrchen macht man sich leicht in ein paar Stunden. Sie können dann beliebig oft gebraucht werden. Um das Blut leicht aufsaugen zu können, müssen sie aber nach jeder Anwendung gut gereinigt und getrocknet werden[1]).

Die Reinigung der Capillarröhre geschieht in der Weise, daß man sie erst mit $10^0/_0$ Natronlauge füllt und einige Stunden liegen läßt, dann einigemal mit Wasser ausspült. Die Capillarröhren füllen sich mit der betreffenden Flüssigkeit leicht von selbst, wenn man nur dafür Sorge trägt, daß das Lumen nirgends von zurückgebliebenen Flüssigkeitstropfen zugedeckt ist. Solche Tropfen werden dann zuerst von der Ampulle aus gegen ein Stück Filtrierpapier ausgeblasen. Die Füllung vollzieht sich dann von selbst, wenn die der Ampulle entgegengesetzte Mündung an die Flüssigkeit gebracht wird.

Das Trocknen der Capillaren geschieht am einfachsten in der Weise, daß man die Ampulle der Capillare in einen durchbohrten Korkstopfen einsteckt, der die eine Mündung eines Glasrohrs zuschließt, während das andere Ende des Glasrohrs mittels eines Gummischlauchs mit einer gewöhnlichen Wasserstrahlpumpe in Verbindung gebracht wird. In 30 Sekunden ist das Capillarrohr dabei ganz trocken, wenigstens wenn man die freie Mündung des Rohrs in die Nähe einer Flamme hält, das Lumen also mit heißer Luft durchzogen wird.

Ein in dieser Weise präpariertes Capillarrohr saugt sehr schnell und glatt das Blut auf. Nach ein paar Minuten koaguliert das Blut. Man muß deshalb sofort nach der Abwägung der einzelnen Blutproben das Capillarrohr in der unten beschriebenen Weise in den Korkstopfen des Destillationskolbens einfügen und das Blut sogleich in den Kolben hineinspritzen. Dies geht sehr gut, wenn man nur einige wenige Bestimmungen zu machen hat. Hat man dagegen viele Proben zu machen, ist es vorteilhafter, zuerst die einzelnen Blutproben zu nehmen, dann in einer Reihe sämtliche Proben zu wägen und dann in den Destillationskolben einzuführen. Man muß dann besondere Vorrichtungen treffen, um die Koagulation zu verhüten. Das wird

[1]) Die Capillarröhrchen sind auch durch G. Werner, Med.-chemisches Institut, Lund, zu beziehen.

aber ganz notwendig, wenn man das Blut längere Zeit in dem Capillarrohr zu verwahren wünscht. Dies wird in der Weise erreicht, daß man das Capillarrohr nach beendigter Trocknung heiß gesättigtes Kaliumoxalat aufsaugen läßt, die Oxalatlösung sofort ausbläst und das Capillarrohr wieder wie früher trocknet, wobei sich feinste Krystallnadeln an der Wand des Rohres bilden, die das Aufsaugen des Blutes nicht stören und eine, wenigstens ausgiebigere Koagulation verhindern.

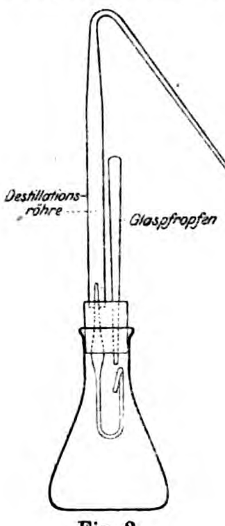


Fig. 3.

Das Inordnunghalten der Capillarröhren erfordert also eine gewisse Zeit, es bietet aber diese Arbeit den großen Vorteil, daß sie leicht auch von einem ungeschulten Laboratoriumsdiener ausgeführt werden kann, und da außerdem die Capillarrohre sehr leicht zu machen sind, können sie in großer Anzahl vorrätig sein und brauchen dem Untersucher nicht mehr Beschwerde zu machen als die Papierstücke bei der Bangschen Blutzuckerbestimmung.

B. Die Destillationsröhren haben die Form, die aus der Fig. 3 hervorgeht. Sie haben eine Länge von etwa 8 bis 12 cm. Beim Abschneiden der Röhren muß man dafür Sorge tragen, daß der Schnittrand möglichst eben wird. Durch Erwärmung in einer Flamme werden sie dann etwas geglättet. Die Öffnung des ausgezogenen schmalen Teiles der Destillationsröhre darf nicht zu klein sein, muß wenigstens eine kräftige Stecknadel durchlassen, sonst kann leicht ein Überdruck in dem Destillationssystem entstehen.

Zusammensetzung der Destillationsapparate.

Die Apparatur ist somit außerordentlich einfach und der ganze Apparat läßt sich in einigen Momenten zusammensetzen. Es wird das Capillarröhrchen mit der Ampulle in den Korkstopfen (Bohrung A) fest eingesteckt, der Korkstopfen in den 50 ccm fassenden Erlenmeyerkolben eingepreßt, die Destillationsröhre in die ringförmige Furche über der Mündung des Capillar-

rohres gedrückt. Das System wird geschlossen durch Zuschließen der zweiten Bohrung (B) mittels des Glaspfropfens. Zusammengesetzt hat der Apparat das Aussehen, wie es Fig. 3 wiedergibt.

Ausführung der Bestimmung.

Die nötige Anzahl Destillationskolben werden je mit 4 ccm der Uranylacetatlösung beschickt und gut passende Korkstopfen im voraus für die einzelnen Kolben ausgewählt. Da die Titrierflüssigkeiten sich sehr oft von Tag zu Tag verändern und das Wasser nicht immer derselben Reinheit ist, ist es am sichersten, jeden Tag eine oder zwei Blindproben gleichzeitig mit den anderen Bestimmungen zu machen, um den Titer zu stellen. Im allgemeinen habe ich eine Blindprobe am Anfang und am Ende jeder Untersuchungsserie gesetzt.

Aufnehmen der Blutprobe und Abwägung.

Nachdem sämtliche Capillaren, die für ein Individuum bestimmt sind, mittels der Torsionswage abgewogen und die Werte notiert worden sind, wird die Haut mit Sublimat abgewaschen und getrocknet. Nach dem Einstecken wird das hervorquellende Blut sofort in das Capillarröhrchen aufgezogen, wobei dies am besten etwa wagerecht, das ampulläre Stück nach unten, das entgegengesetzte, mit der Mündung gegen den Blutstropfen, nach oben gehalten wird. Übrigens sieht man sogleich selbst, wie das Röhrchen am zweckmäßigsten zu halten ist, je nachdem das Blut hineingezogen wird. Im allgemeinen lasse ich, wenn so viel Blut erhalten werden kann, das Röhrchen sich so weit füllen, wie die schattierten Teile in Fig. 2 zeigen. Nachdem das Röhrchen sich gefüllt hat, wird die Außenseite an der Eintrittsstelle des Blutes mit Filtrierpapier von Blut abgetupft. In ähnlicher Weise werden dann die anderen Capillarröhrchen gefüllt. Nachher werden die Röhrchen wieder gewogen und dann mittels der Ampulle in der Bohrung A eines Korkstopfens festgemacht, dann der Korkstopfen in einen Destillationskolben fest eingedrückt, wobei natürlich die Bohrung B offen sein muß. Wenn das Blut in dem Capillarröhrchen längere Zeit aufbewahrt werden soll, wird dann auch die Bohrung B mittels des Glaspropfens geschlossen und die Mündung des Capillarröhrchens oberhalb der Korkstopfen mittels eines Gelatinepfröpfchens (etwa

10 %) zugemacht. Die Gelatine läßt man am besten in langen Glasröhren erstarren (wie Mettsche Rohre), von welchen je nach Bedarf 1 cm lange Stücke abgeschnitten werden. So präpariert kann man die Blutprobe im Brutschrank digerieren lassen.

Wenn dies nicht die Absicht ist, spritzt man, nachdem der Korkstopfen mit dem Capillarröhrchen in dem Destillationskolben festgemacht ist, das Blut in diesen hinein. Man bedient sich dazu der Spritze, die oben (4) angegeben ist und die mit Wasser gefüllt ist. Die Öffnung der Spritze wird dabei über die aufstehende Mündung der Ampulle geschoben und fest gegen den Korkstopfen gedrückt und dann $^1/_2$ bis 1 ccm Wasser eingespritzt. Mittels eines etwa 10 cm langen Glasrohres, das in derselben Weise über die Mündung der Ampulle gegen den Korkstopfen gedrückt wird, wird dann das in dem Capillarröhrchen zurückgebliebene Wasser ebenfalls in den Destillationskolben eingeblasen. Erst dann wird die Bohrung B mit dem Glaspfröpfchen geschlossen und die Destillationsröhre in seine Furche rings der Capillarmündung festgedrückt. Die Proben können dann in mehreren Stunden, ja bis zum nächsten Tag stehen bleiben, bis man Zeit hat, die Destillation auszuführen. Beim Hineinspritzen des Blutes darf nicht zu viel Wasser gebraucht werden.

Die Destillation.

Vor der Destillation sind eine genügende Anzahl Vorlagen in Ordnung zu stellen. Die 25 ccm Erlenmeyerkolben werden mit 2 ccm $^n/_1$-Natronlauge und 5 bis 6 ccm möglichst reinen Wassers beschickt. Unmittelbar vor der Destillation wird dann in einem solchen Kolben 1 bis 2 ccm $^n/_{200}$-Jodlösung abgemessen, am besten mit einer Pipette. Insgesamt soll die ganze Menge der Vorlageflüssigkeit etwa 9 ccm betragen.

Die Destillation braucht nur etwa 70 bis 80 Sekunden. Der Destillationskolben wird entweder auf ein Drahtnetz gestellt oder in einer Klemme festgemacht. Die Aufwärmung erfolgt durch eine leicht regulierbare Flamme, die mit Schornstein geschützt ist. Am besten ist es, wenn der Boden des Destillationskolbens nur etwa 1 cm von der Mündung des Schornsteins entfernt ist.

Die Höhe der Flamme wird von dem Grad des Schäumens der Uranacetatlösung bestimmt. Das Schäumen reagiert schnell auf jede Veränderung der Flammenhöhe. Gewinnt es einen solchen Grad, daß die Mündung des Capillarrohres allzu nahe an die Flüssigkeit zu kommen scheint, wird die Flamme ein wenig zurückgedreht. Nach einigen Destillationen ist die passende Einstellung der Flamme erreicht und kann später in dieser Stellung behalten werden.

Während der ganzen Destillation wird der Vorlagekolben so dicht an der Mündung des Destillationsrohres gehalten, daß sie so tief wie möglich in die alkalische Jodlösung eintaucht.

Während der Anwärmung des Destillationskolbens entweichen aus der Mündung der Destillationsröhre große Luftblasen. Wenn die Uranylacetatlösung ins Sieden gekommen ist und die Wasserdämpfe die Luft verdrängt haben, hört die Blasenbildung auf einmal auf, und es entsteht ein charakteristisches, zischendes, schmetterndes Geräusch. Wenn dieses Geräusch ganz aufgehört hat, beginnt nach einigen Sekunden die Flüssigkeit der Vorlage zu kochen. Die Vorlage wird rasch so weit gesenkt, daß die Mündung der Destillationsröhre dicht oberhalb der des Vorlagekolbens steht. Nach Abspritzen der Destillationsröhre mit einigen Tropfen Wasser wird die Flamme weggeschoben und die Vorlage im Wasserstrahl abgekühlt oder bequemer in ein Kühlbecken gestellt, und man kann mit der Destillation der nächstfolgenden Probe anfangen usw. Erst nachdem sämtliche Destillationen vorüber sind, braucht man mit dem Titrieren anzufangen.

Wenn die Flamme richtig eingestellt ist, dauert es etwa 25 Sekunden, bis die Uranylacetatlösung zu sieden beginnt, 35 Sekunden, bis die Luftblasen abgegangen sind und das schmetternde Geräusch sich vernehmen läßt, etwa 70 bis 80 Sekunden, bis die Vorlageflüssigkeit zu sieden beginnt. Ohne Schaden können diese Zeiten in jeder beliebigen Weise verändert werden, wenn man nur darauf achtet, daß die Destillation bei beginnender Kochung des Jodgemisches abgebrochen wird. Eine beträchtliche Verkürzung der Destillationszeit läßt sich wohl aber nicht erreichen, da das Schäumen der Uranacetatlösung zu kräftig wird.

Nach beendigter Destillation werden die Destillationsrohre

von den Korkstopfen weggenommen und das Kondenswasser abgeschlagen, damit die Korkstopfen in der Luft trocknen können.

Das Titrieren.

Die in beschriebener Weise erhaltenen abgekühlten Destillate können sofort titriert werden. Sie können aber auch bis eine halbe Stunde vor der Titration dahinstehen.

Wenn man zur Titration fertig ist, wird das Destillat mit 3 ccm $^n/_1$-Schwefelsäure versetzt, dann 5 Tropfen $5\,^0/_0$iger Jodkaliumlösung hinzugefügt (um die Zurückbildung der gebildeten Jodate zu beschleunigen) und nach Zusetzen von 2 bis 3 Tropfen Stärkelösung nach $^1/_2$ bis 1 Minute mit $^n/_{200}$-Thiosulfatlösung titriert. Wegen des Jodkaliums, der relativ großen Salzkonzentration und der geringen Flüssigkeitsmenge ist der Umschlag außerordentlich scharf. Die Bürette für die Thiosulfatlösung muß wenigstens 0,01 ccm ablesen lassen.

0,01 ccm $^1/_{200}$-Thiosulfatlösung entspricht 0,484 γ (= 0,000484 mg) Aceton.

Motivierung und Belege für die einzelnen Maßregeln.

Die Jodoformbildung. Ebenso wie die Reaktion des Jods mit den Verunreinigungen des Wassers eine nicht unbeträchtliche Zeit erfordert, ist auch die Reaktion mit Aceton in alkalischer Lösung, deren Endprodukt das Jodoform darstellt, ein verhältnismäßig langsam sich abspielender Prozeß.

Dieser Prozeß kann aber in verschiedener Weise beschleunigt werden.

Bekanntlich hat die Umrührung eine solche beschleunigende Einwirkung. 20 ccm $H_2O + 1$ ccm $^n/_1$-Lauge mit 20,5 γ Aceton vorgelegt, nach 20 Minuten wird gefunden

bei	fünfmaliger Umrührung	(jedesmal	15 Sekunden)		15,0 γ
„	viermaliger	„	do.	do.	13,3 γ
„	dreimaliger	„	do.	do.	13,0 γ
„	zweimaliger	„	do.	do.	11,0 γ
„	einmaliger	„	do.	do.	9,9 γ

Sehr wichtig ist auch, daß die Flüssigkeit eine genügende Alkalinität hat.

Von vorgelegten 20,5 γ sind in 5 Minuten zur Jodoformbildung verbraucht:

in 1 ccm $^n/_1$-Lauge	+	0 ccm	H_2O	—	11,6
„ 1 „ „	+	2 „	„	—	11,6
„ 1 „ „	+	5 „	„	—	10,4
„ 1 „ „	+	10 „	„	—	6,5

Von vorgelegten 20,5 γ Aceton in einem Gemisch von 14 bzw. 11 ccm H_2O + 1 bzw. 4 ccm $^n/_1$-Lauge + 1 ccm $^n/_{200}$-Jod wird gefunden:

	1 ccm-Lauge	4 ccm-Lauge
Nach 5 Minuten	14,5	18,0
„ 10 „	16,0	18,9
„ 15 „	18,4	19,9
„ 20 „	19,9	19,9

Vielleicht geht die Bedeutung der Alkalikonzentration noch besser aus folgender Serie hervor. Sämtliche Proben enthalten 20,5 γ Aceton.

Titrieren nach 5 Minuten. Gefunden:

1.	1 ccm $^n/_1$-Lauge	+ 15 ccm H_2O	10,0	Aceton
2.	2 „ „	+ 13 „ „	16,4	„
3.	3 „ „	+ 11 „ „	18,0	„
4.	4 „ „	+ 9 „ „	18,9	„
5.	5 „ „	+ 7 „ „	20,6	„
6.	6 „ „	+ 5 „ „	—	„
7.	7 „ „	+ 3 „ „	19,9	„
8.	8 „ „	+ 1 „ „	19,9	„
9.	9 „ „	+ 0 „ „	19,9	„

Große Bedeutung für die Geschwindigkeit der Jodoformbildung hat endlich die Temperatur, gerade wie für die Reaktion des Jods mit den das Wasser verunreinigenden Substanzen.

Gelegentlich eines Fehlers der Wärmeleitung an einem kalten Wintertag, wo die Zimmertemperatur im Laboratorium nur 10° betrug, machte ich die Beobachtung, daß die Jodoformbildung unter sonst gleichen Versuchsanordnungen viel träger erfolgte, als ich sonst zu sehen gewöhnt war. Ich untersuchte deshalb die Jodoformbildung in zwei Serien, von denen ich die erste bei Zimmertemperatur (10°) bleiben ließ, die Proben der zweiten Serie aber wurden in 20° warmes Wasser gestellt. Jede Probe enthielt 10 ccm H_2O + 1 ccm $^n/_1$-Lauge + 2 ccm $^n/_{200}$-Jod + 61,5 γ Aceton.

Die einzelnen Proben gaben nach in der Tabelle angegebener Zeit folgende Werte:

	10°	20°
5 Minuten	52,3	57,6
10 „	57,6	60,5
20 „	61,0	61,0

Obwohl ich nun bei meinen späteren Untersuchungen Rücksicht auf diese Verhältnisse nahm, kam es mir oft, solange ich mit dem Bangschen Destillationsapparat arbeitete, vor, daß die Jodoformbildung mitunter eine ungewöhnlich lange Zeit brauchte.

Oft bekam ich Werte, die die berechnete Menge nicht erreichten, ihr aber sehr nahe kamen. Obwohl die Differenzen so gering waren, daß sie gewiß als innerhalb der Fehlerquellen liegend betrachtet werden können, kam mir dies so bemerkenswert oft vor, daß es mir eine gewisse Empfindung der Unsicherheit beibrachte. Dieses Verhältnis schien damit zusammenzuhängen, daß mit dem Bangschen Apparat die Wassermenge der Vorlage notwendigerweise ziemlich groß werden muß. Denn wenn ich mit kleineren Flüssigkeitsmengen zu arbeiten anfing (etwa 10 ccm), kamen Schwierigkeiten dieser Art nicht vor.

In seiner früher erwähnten Arbeit hat Widmark gezeigt, daß bei noch höheren Temperaturen als denjenigen, die oben geprüft worden sind, die Jodoformbildung sehr schnell geht, ja schneller sogar als die Abdampfung des Acetons. Er destilliert deshalb das Aceton in ein alkalisches Jodgemisch über bei nur geringer Kühlung, wobei das Gemisch bis etwa 50° aufgewärmt wird.

Meine hierauf gerichteten Untersuchungen haben dies bestätigt. Je höher die Temperatur ist, desto schneller geschieht die Jodoformbildung. In Siedehitze geht alles Aceton momentan in Jodoform über.

Dabei sind aber unbedingt zwei Maßregeln zu beobachten. Wegen der Veränderung des Jodtiters muß man sowohl die Erwärmungszeit wie den Grad der Erwärmung kontrollieren können. Bei Prüfung der Widmarkschen Methode bekam ich deshalb anfangs ziemlich beträchtliche Fehler, denn es ist bei dieser Methode nicht leicht, den Grad der Erwärmung zu kontrollieren.

Ein Grad der Erwärmung, der leicht wahrzunehmen und innezuhalten ist, ist aber der Kochpunkt. Und, wie ich später

nachweisen werde, ist es, wenn man ein beginnendes Sieden als Endpunkt der Destillation erwählt, nicht so genau, wenn die Erwärmung etwas mehr oder weniger Zeit in Anspruch nimmt. Ein anderer Vorteil, der sich aus dieser Erwärmung ergibt, ist der, daß der Jodtiter, wie ich gezeigt habe, dann $^1/_2$ bis 1 Stunde ganz unverändert bleibt.

Hierzu als Belege einige Resultate, die erhalten wurden bei Aufkochen und sofortigem Abkühlen und Titrieren einiger Proben, die 4 ccm H_2O + 2 ccm Lauge + 2 ccm $^1/_{200}$-Jodlösung + Aceton in angegebener Menge enthalten.

Aceton	
vorgelegt	gefunden
20,07	20,32
40,14	40,41
60,20	60,16
80,27	80,60

Unter solchen Umständen habe ich bei der Destillation von der Kühlung abgesehen und somit die ganze Destillation außerordentlich vereinfachen können.

Zum Einfluß von Intensität und Dauer der Erwärmung. Ein 100 ccm-Kolben mit 10 ccm Wasser wird bis zum Sieden erwärmt. Die Dämpfe wurden in einer Vorlage mit 8 cmm Wasser + 1 ccm Lauge + 1 ccm $^n/_{200}$-Jod während genau 90 Sekunden eingeleitet, die Vorlage in fließendem Wasser abgekühlt (Methodik von Widmark). Hierbei wurde die Flüssigkeit der Vorlage mäßig erwärmt. Die Intensität des Kochens wurde, soweit möglich, in den einzelnen Proben gleich kräftig gemacht. Ich bekam dabei in 4 Proben einen Titer von 0,99, 0,96, 1,00, 0,96.

Wenn dieselbe Mischung 3 Minuten im Wasserbad aufgewärmt und dann abgekühlt wurde, bekam ich bei 40° 0,98, bei 50° 0,97, bei 70° 0,94.

Vier ähnliche Proben, bis zum Sieden erhitzt und dann abgekühlt, ergaben alle den Titer 0,93.

Dies zeigt also, daß konstante Titerwerte bei Erhitzen zum Sieden leichter zu erhalten sind als bei nicht kontrollierten niedrigeren Wärmegraden.

In den folgenden Versuchen (nach meiner Methode) wird die Erwärmungszeit mit zwei Zahlen bezeichnet: die erste gibt

die Zeit vom Anfang der Destillation bis zum Anfang des Dampfabgangs (= Anfang des schmetternden Geräusches) an, die zweite Zahl die Zeit vom Beginn dieses Geräusches bis zum Abschließen der Destillation. Die Destillation wurde in den einzelnen Proben bei verschiedenem Grade der Erwärmung abgebrochen, die Erwärmungszeit durch Einstellen der Flamme verschieden lang gemacht.

Bei sämtlichen Versuchen: Destillationskolben mit 4 ccm Wasser, Vorlage mit 4 ccm Wasser + 2 ccm $^n/_1$-Lauge + 1 ccm Jodlösung. Ohne Erwärmung entspricht dieses Gemisch 0,99 ccm $^n/_{200}$-Thiosulfat.

Destillationskolben Erwärmungszeit	Vorlage Grad der Erwärmung	Titer
25 + 3 Sekunden	Beginnendes Geräusch	0,99
25 + 10 „	Am Schluß des Geräusches	0,97
25 + 15 „	Anfang des Siedens	0,95
20 + 15 „	„ „ „	0,95
15 + 10 „	„ „ „	0,95
45 + 20 „	„ „ „	0,95
60 + 50 „	„ „ „	0,95
25 + 20 „	Kräftiges Sieden	0,95
25 + 30 „	10 Sekunden Sieden	0,94
25 + 35 „	10 „ „	0,93

Es geht also aus diesen Zahlen hervor, daß man einen konstanten Titer bekommt, wenn man die Destillation irgendwo in dem Zeitabschnitt zwischen dem Aufhören des zischenden Geräusches und dem Eintritt des kräftigen Kochens unterbricht. Dies ist eine Forderung, der leicht zu genügen ist. Damit man sicher sei, daß alles Aceton übergegangen ist, ist es aber am besten, die Erwärmungszeit bis zum Anfang des kräftigen Siedens auszustrecken. Gewiß kommt man dabei der Möglichkeit, eine Titerabnahme durch zu heftiges und langes Sieden hervorzurufen, näher. Wenn man aber die Vorlage mit der Hand hält, verbietet die dabei sofort erfolgende große Hitze ebenso wie das kräftige Sprudeln ein zu langes Sieden.

Die Menge der Vorlageflüssigkeit hat eine gewisse Bedeutung für den Titer. Mit 2 ccm Lauge und 1 ccm Jod in der Vorlage erhielt ich in Versuchen wie den obigen einen Titer von 0,96, mit 2 ccm Wasser 0,95, mit 4 ccm 0,95, mit 6 ccm 0,94. Die Flüssigkeitsmengen müssen also sehr beträchtlich

differieren, um gröbere Störungen bei der Bestimmung hervorzurufen. Je unreiner das Wasser, desto größer werden die Fehler, desto genauer muß man bei der Abmessung verfahren. Jedenfalls genügt die Abmessung mit graduiertem Glaszylinder.

Die Flüssigkeitsmenge des Destillationskolbens übt dagegen auf den Titer keine Einwirkung. Der Titer derselben $^{n}/_{200}$-Jodlösung, die in den vorigen Analysen gebraucht wurde, fand ich = 0,95 in 5 Versuchen, mit bzw. 2, 4, 6, 8 und 10 ccm Wasser in dem Destillationskolben.

Wenn nun auch die Wassermengen innerhalb der hier gezogenen Grenzen für den Jodtiter fast ohne Bedeutung sind, muß man doch die bei der Beschreibung angegebenen Mengen innehalten. Das Überdestillieren des Acetons beansprucht eine gewisse Zeit, die Austreibungszeit fällt hauptsächlich mit dem Zeitabschnitt zusammen, während dem das zischende Geräusch sich vernehmen ließ, also etwa von dem Moment an, wo die Flüssigkeit des Destillationskolbens in kräftiges Sieden gekommen ist, bis zu dem Augenblick, wo die Flüssigkeit in der Vorlage zu kochen beginnt. Diesem Abschnitt der Destillation muß deshalb eine genügende Dauer gegeben werden, und offenbar erfolgt dies am leichtesten durch Regulierung der Flüssigkeitsmengen im Destillationskolben bzw. in der Vorlage. Je weniger Wasser und damit die Dampfbildung in dem Destillationskolben, und je größer die Quantität der Vorlage ist, um so länger wird die Austreibungszeit. Es würde zu weit führen, die einzelnen Belege vorzulegen, auf denen sich die oben aufgestellte Forderung: im Destillationskolben etwa 4 ccm, in der Vorlage 9 ccm, stützt. Die dadurch erhaltene Austreibungszeit ist unter allen Verhältnissen zum Überdestillieren von 85 γ hinreichend und wahrscheinlich bedeutend mehr. Ich habe z. B. bis 157 γ quantitativ bei der Destillation zurückbekommen. Jedenfalls ist es leicht, die Tragfähigkeit nach oben je nach Wunsch durch Vermehrung der Wassermenge der Vorlage zu erweitern.

Die Destillation. Von dieser ist nicht viel mehr hinzuzufügen, höchstens eines. Da bei der Destillation ein wenig Kondenswasser in der Destillationsröhre entsteht und sich auf dem vom Korkstopfen gebildeten Boden bis oberhalb der Mündung des Capillarrohres ansammelt, könnte es scheinen, als wäre

es besser, wenn die Mündung des Capillarrohres noch höher in der Destillationsröhre aufreichte, als ich es vorgeschlagen habe. Ich habe aber oft gesehen, daß man sich vor zu tiefen und engen Blindräumen in der Leitung hüten muß, denn sonst bekommt man leicht nicht unbeträchtliche Verluste.

Genauigkeit der Methode.

24 Erlenmeyerkolben (25 ccm) werden mit 2 ccm Lauge, 2 ccm $^1/_{200}$-Jodlösung und mit Wasser zu einem Totalvolumen von 9 ccm beschickt und in 3 Serien geordnet. Den Proben der ersten Serien wird die Acetonlösung direkt zugesetzt; sie blieben unter Umschütteln 10 Minuten stehen und dann titriert. Die Proben der zweiten Serie wurden ebenfalls direkt mit der betreffenden Acetonmenge versetzt, sofort aufgekocht, abgekühlt und titriert. In den Proben der dritten Serie wurde das Aceton wie oben überdestilliert. Die Acetonlösung enthielt 20,65 γ pro Kubikzentimeter. Die Acetonlösung wurde mit Pipette aufgemessen.

Aceton vorgelegt γ	Serie I Gefunden	Serie I Fehler %	Serie II Gefunden	Serie II Fehler %	Serie III Gefunden	Serie III Fehler %
5,2	5,0 — 0,2	= 4,0	4,36 — 0,80	= 15,0	5,0 — 0,2	= 4,0
10,3	10,1 — 0,2	= 1,0	10,3 ± 0	= 0	10,3 ± 0	= 0,0
20,7	20,6 — 0,1	= 0,5	20,8 + 0,1	= 0,5	20,3 — 0,4	= 2,0
41,3	40,1 — 1,2	= 3,0	40,9 — 0,4	= 1,0	39,9 — 1,4	= 3,0
62,0	61,7 — 0,3	= 0,5	62,1 + 0,1	= 0,2	62,1 + 0,1	= 0,2
82,6	82,3 — 0,3	= 0,4	83,2 + 0,6	= 0,7	81,8 — 0,8	= 1,0

Ochsenblut, 0,1 ccm 41,294 γ Aceton enthaltend, mit Pipette aufgemessen.

Blut ccm	Aceton gefunden γ	Aceton berechnet γ	Fehler
0,05	21,3	20,6	+ 0,7 = 3,0 %
0,10	42,6	41,3	+ 1,3 = 3,0 %
0,15	64,9	62,0	+ 2,9 = 4,0 %
0,20	87,6	82,6	+ 5,0 = 6,0 %
0,04	16,5	16,5	± 0 = 0,0 %
0,06	26,1	24,8	+ 1,3 = 5,0 %
0,08	34,6	33,0	+ 1,6 = 5,0 %
0,12	51,3	49,6	— 1,7 = 3,5 %

In allen diesen Analysen haben sich also etwas zu hohe Werte ergeben. Da ich sonst bei Destillieren von reinem Blut im allgemeinen keinen Jodverbrauch gesehen habe, bin ich geneigt, die Ursache in dem Abpipettieren des Blutes, die ziemlich schwierig mit einer gewöhnlichen Pipette genau zu machen ist, zu suchen.

In den folgenden Versuchen wurde die Acetonlösung im Capillarrohr abgewogen. Acetonlösung = 41,294 g pro 1 ccm.

Acetonlösung	Aceton gefunden	Aceton berechnet	Fehler
mg	g	g	
100	40,6	41,3	— 0,7 = 2,0 %
111	46,0	45,8	— 0,2 = 0,5 %
100	40,2	41,3	— 1,1 = 2,5 %
69	26,6	28,9	— 2,3 = 8,0 %

Blutuntersuchung in einem Fall von schwerem Diabetes mit hochgradiger Acidose.

92 mg Blut	20,0 γ Aceton	= 21,5 mg	auf 100 g Blut
83 „ „	18,9 γ „	= 23,0 „	„ 100 „ „
99 „ „	21,2 γ „	= 21,2 „	„ 100 „ „
64 „ „	14,5 γ „	= 22,5 „	„ 100 „ „
70 „ „	15,6 γ „	= 22,1 „	„ 100 „ „

Derselbe Patient am folgenden Tag = Hungertag.

64 mg Blut	9,5 γ Aceton	= 15,0 mg	auf 100 g Blut
95 „ „	14,5 γ „	= 15,0 „	„ 100 „ „
112 „ „	16,4 γ „	= 14,4 „	„ 100 „ „
59 „ „	9,1 γ „	= 15,1 „	„ 100 „ „
59 „ „	10,2 γ „	= 17,3 „	„ 100 „ „

In diesen beiden Serien lagen in den zwei lezten Versuchen die Capillarröhrchen nach der Blutaufnahme 15 Minuten, ehe sie gewogen und in den Destillationskolben eingeführt wurden.

Zuletzt sei erwähnt, daß das Aceton, das für die Kontrollversuche angewandt worden ist, aus gewöhnlichem käuflichen Aceton durch Fällung mit Natriumbisulfit, Spaltung mit Natriumcarbonat und zweimal wiederholte fraktionierte Destillation gewonnen war. Das in dieser Weise gereinigte Aceton wurde in Glasampullen eingeschlossen und aufbewahrt.

Zur Theorie der Muskelcontraction.
Entgegnung[1])

von

Wolfgang Pauli-Wien.

(Aus dem Universitätslaboratorium für physikalisch-chemische Biologie, Wien.)

(Eingegangen am 2. Juni 1919.)

E. Baur[1]) bemüht sich in seiner Notiz, die mir zugeschriebene Annahme, daß der Quellungsdruck (sc. der Muskelfibrille) eine Funktion der Acidität oder, wie B. an anderer Stelle sagt, der $H^{\cdot}$-Konzentration sei, als energetisch unzureichend für die Muskelleistung nachzuweisen, da für diese nur die osmotische Arbeit des Konzentrationsausgleiches der $H^{\cdot}$-Ionen von $4{,}10^{-3}$ auf 10^{-7} zur Verfügung stände.

Der Leser meiner Abhandlung[2]) wird sich vergeblich bemühen, in derselben für die unsinnige Behauptung, daß der Quellungsdruck (von Eiweiß) eine Funktion der H-Ionenkonzentration sei, auch nur den geringsten Anhaltspunkt zu entdecken. Es wurde ja in einer Reihe von Arbeiten aus meinem Institute sowohl für die Bildung von Säureeiweiß als auch insbesondere für die Quellung der experimentelle Beweis erbracht, daß für deren Ausmaß die freien H-Ionen der Säure nicht maßgebend sind. In unserer Muskelabhandlung wurde überdies der Mechanismus der Drucksteigerung in einer Eiweißlösung durch Bildung von Säureeiweiß auch auf Grund eigener Versuche eingehend erörtert. Danach führt die vom Fibrillen-

[1]) Emil Baur, Notiz zur Theorie des Muskelmotors. Diese Zeitschr. **94**, 44, 1919. — E. Herzfeld und R. Klinger, ebenda **94**, 1, 1919.

[2]) Kolloidchemie d. Muskelcontraction, Th. Steinkopff. Dresden 1912.

eiweiß neutralisierte Milchsäure zur Entstehung eines Eiweißsalzes, das infolge des kolloiden Charakters des vielwertigen Eiweißions auch mit allen seinen Säureionen osmotisch zur Wirkung kommt. In diesem Sinne wird der Quellungsdruck von der Milchsäurekonzentration bestimmt. Auch diese „Verbesserung", die Baur den Autoren Herzfeld und Klinger[1]) zuschreibt, ist also von denselben meiner Arbeit entnommen. Da diese Autoren auch nicht einen einzigen neuen Versuch angestellt haben, könnte der Fortschritt in ihrer Arbeit nur in der Einführung neuer Vorstellungen liegen. Solche sind die Annahme einer eiförmigen Mantelhülle von Wasser und Abbauprodukten um die Fibrillenteilchen, ausgestattet mit einer eigenartigen „Flüssigkeitsspannung", die mit dem Begriff der „Oberflächenspannung nichts Wesentliches gemeinsam hat". Denn der Begriff der Oberflächenspannung scheint den gestrengen Autoren „noch ungenügend abgeklärt". Sie verstehen unter Flüssigkeitsspannung „das Bestreben aller flüssigen und halbflüssigen Massen, die Kugelform anzunehmen, wenn sie äußeren Krafteinwirkungen nicht unterworfen sind". Hier dürften wohl wieder die Physiker die Abgeklärtheit vermissen.

Im Sinne der klassischen Untersuchungen Ebners haben wir uns einstweilen mit der allgemeinen Anschauung eines der optischen Anisotropie entsprechenden Baues — von Ebner auf Wachstumsspannungen bezogen — als Unterlage der Quellungsverkürzung der Muskelfaser bescheiden zu müssen geglaubt. Den Vorwurf von H. und K., daß es uns nicht gelungen ist, „in den geahnten Zusammenhang wirklich einzudringen", müssen wir hinnehmen, da wir gerne auf spezialisierte Annahmen verzichten, die einer tatsächlichen Grundlage oder aufklärenden Wirkung entbehren.

---

[1]) E. Herzfeld und R. Klinger, diese Zeitschr. 94, 1, 1919.

Berichtigung zu Seite 157 dieses Bandes:

statt $CH_3 \cdot CHOH \cdot SO_2Na$ muß es heißen $CH_3 \cdot CHOH \cdot SO_3Na$ und
„ $(CH_3 \cdot CHOH \cdot SO_2)Ca$ „ „ „ $(CH_3 \cdot CHOH \cdot SO_3)_2Ca$.

Autorenverzeichnis.

Druck von Oscar Brandstetter, Leipzig.





